

**Cu/Zn SUPEROXIDDISMUTASE AUS NORMAL-MILZ
UND LYMPHOM-MILZ DES MENSCHEN.
QUANTITATIVER VERGLEICH DER SUPEROXID-
DISMUTASE-AKTIVITÄT IN LEUKOCYTEN
VON GESUNDEN SPENDERN UND
VON LYMPHOM-PATIENTEN.**

SIEGFRIED PRENNINGER

*Diss
München
1984*

Aus der Medizinischen Klinik III
des Klinikums Großhadern
der Universität München
Direktor Prof. Dr. W. Wilmanns

"Cu/Zn Superoxiddismutase aus Normal-Milz und Lymphom-Milz
des Menschen. Quantitativer Vergleich der Superoxiddismutase-
Aktivität in Leukocyten von gesunden Spendern und von Lymphom-
Patienten"

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Siegfried Prenninger
aus
Landshut
Jahr
1983

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

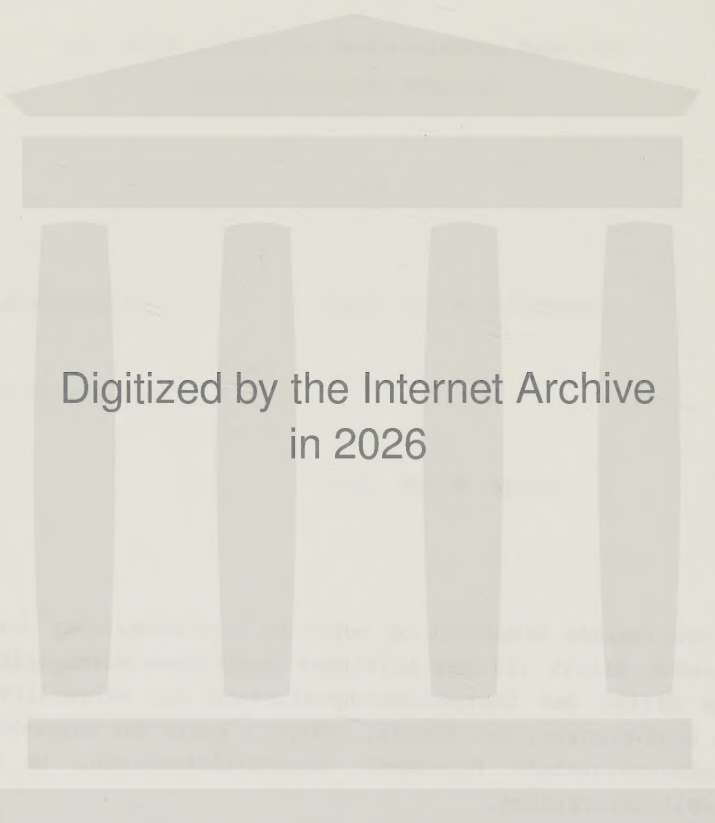
Berichterstatter : Prof. Dr. W. Wilmanns

Mitberichterstatter:

Dekan : Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 26. Juli 1984

Die vorliegende Dissertation wurde im Forschungslabor der Medizinischen Klinik III des Klinikums Großhadern durchgeführt und durch Mittel der Curt-Bohnewand-Stiftung der Universität München (SOD-Projekt, Dr. Issels, 1980/81) sowie der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Kennwort: Superoxiddismutase, Is 31/1-1, 1982/83) unterstützt.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554007_0004

"So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig, man muß sie für fertig erklären, wenn man nach Zeit und Umständen das Mögliche gethan hat."

(J.W.Goethe)

Meinen Eltern
und meinem Freund Gerhard Groeneveld
in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. E I N L E I T U N G	1
1.1. Biologische Quellen für Sauerstoffradikale	1
1.2. Biologische Funktion und Vorkommen der Superoxiddismutasen	2
1.3. Klinisch-pathophysiologische Gesichtspunkte	5
1.4. Engere Problemstellung	6
2. M A T E R I A L U N D M E T H O D E N	8
2.1. Geräte	8
2.2. Chemikalien und Reagenzien	10
2.3. Methoden	12
2.3.1. Allgemeine Methoden	12
2.3.1.1. Proteinnachweis durch direkte Absorptionsmessung bei 280 nm	12
2.3.1.2. Proteinbestimmung nach Lowry	12
2.3.1.3. Proteinbestimmung über molaren Absorptionskoeffizienten	16
2.3.1.4. Hämoglobinbestimmung	16
2.3.1.5. Konduktometrie	19
2.3.1.6. Dialyse	19
2.3.1.7. Ultrafiltration	20
2.3.1.8. Diafiltration	20
2.3.2. Präparation von Lymphocyten und Granulocyten aus menschlichem Vollblut	21
2.3.2.1. Prinzip	21

2.3.2.2.	Durchführung der Präparation	24
2.3.2.3.	Herstellung eines "Percoll"-Dichtegradienten	26
2.3.2.4.	Zelltrennung über einen "Percoll"-Dichtegradienten	26
2.3.2.5.	Aufbereitung der Zellfraktionen	28
2.3.3.	Isolierung von Cu/Zn Superoxiddismutase	29
2.3.3.1.	Prinzip	29
2.3.3.2.	Trennungsgang	29
2.3.4.	Enzymaktivitätsbestimmung der Superoxiddismutase - Indirekte Methode	31
2.3.4.1.	Hemmung der Reduktion von Cytochrom c in Lösung	33
2.3.4.1.1.	Prinzip	33
2.3.4.1.2.	Lösungen für den Testansatz	34
2.3.4.1.3.	Testansatz	35
2.3.4.1.4.	Quantitative Auswertung	36
2.3.4.1.5.	Abhängigkeit der Aktivität der Cu/Zn Superoxiddismutase von verschiedenen Cyanid-Konzentrationen	39
2.3.4.2.	Hemmung der Nitritbildung aus Hydroxylammoniumchlorid in Lösung	41
2.3.4.2.1.	Prinzip	41
2.3.4.2.2.	Lösungen für den Testansatz	42
2.3.4.2.3.	Testansatz	43
2.3.4.2.4.	Quantitative Auswertung	44
2.3.4.2.5.	Abhängigkeit der Aktivität der Cu/Zn Superoxiddismutase von verschiedenen Cyanid-Konzentrationen	45
2.3.4.3.	Hemmung der Photoreduktion von Nitrotetrazoliumblau	47
2.3.4.3.1.	Hemmung der Photoreduktion von Nitrotetrazoliumblau nach vorheriger isoelektrischer Fokussierung	47

2.3.4.3.1.1.	Durchführung	48
2.3.4.3.1.2.	Elektrophoresebedingungen für die isoelektrische Fokussierung	48
2.3.4.3.1.3.	Lösungen	49
2.3.4.3.2.	Hemmung der Photoreduktion von Nitrotetrazoliumblau nach vorheriger Diskgelelektrophorese	49
2.3.4.3.2.1.	Lösungen zur Herstellung der Gele	50
2.3.4.3.2.2.	Gelherstellung	51
2.3.4.3.2.3.	Probenvorbereitung	52
2.3.4.3.2.4.	Durchführung der Elektrophorese	52
2.3.5.	Enzymaktivitätsbestimmung der Superoxid-dismutase - direkte Methode	53
2.3.5.1.	Pulsradiolyse	53
2.3.6.	Spezielle analytische Methoden	55
2.3.6.1.	Auftrennung der Proteine durch isoelektrische Fokussierung	55
2.3.6.2.	Auftrennung der Proteine durch Diskgelelektrophorese auf Gelen	57
2.3.6.3.	Auftrennung der Proteine durch zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese	57
2.3.6.3.1.	Auftrennung durch isoelektrische Fokussierung auf Polyacrylamid-Ampholine-Gelen (1. Dimension)	57
2.3.6.3.1.1.	Lösungen zur Herstellung der Gele	58
2.3.6.3.1.2.	Gelansatz	59
2.3.6.3.1.3.	Auftragen der Proben und Durchführung der isoelektrischen Fokussierung	59
2.3.6.3.2.	Auftrennung der isoelektrisch fokussierten Proteine auf Polyacrylamid-Gradientengel (2. Dimension)	60
2.3.6.3.2.1.	Lösungen für die Gradientengele	60
2.3.6.3.2.2.	Lösungen für das Spacergel	61
2.3.6.3.2.3.	Agaroselösung	61

2.3.6.3.2.4.	Herstellung des Polyacrylamid-Gradienten-	62
	gels	
2.3.6.3.2.5.	Zusammensetzung der Eichproteine	62
2.3.6.3.2.6.	Durchführung der Elektrophorese	63
2.3.6.3.2.7.	Färbung der Gradientengele	64
2.3.6.3.3.	Auswertung	65
2.3.6.4.	Metallgehalt	66
2.3.6.4.1.	Prinzip	66
2.3.6.4.2.	Durchführung der Messungen	66
2.3.6.5.	Molekulargewichtsbestimmung durch SDS-	
	Polyacrylamid Gelelektrophorese	70
2.3.6.5.1.	Lösungen	70
2.3.6.5.2.	Herstellung der Gele	71
2.3.6.5.3.	Vorbereitung der Proben	72
2.3.6.5.4.	Eichproteine	72
2.3.6.5.5.	Probenansätze	73
2.3.6.5.6.	Elektrophorese	73
2.3.6.5.7.	Färbung der Gele	74
2.3.6.5.8.	Auswertung	74
3.	E R G E B N I S S E	76
3.1.	Superoxiddismutase-Gesamtaktivität in	
	Leukocyten gesunder Spender und an	
	Lymphom erkrankter Patienten	76
3.1.1.	Untersuchungen an Lymphocyten	76
3.1.1.1.	Ergebnistabelle	78
3.1.2.	Untersuchungen an Granulocyten	79
3.1.2.1.	Ergebnistabelle	80
3.2.	Isolierung der Cu/Zn Superoxiddismutase	
	aus normaler Milz und aus Lymphom-Milz	
	des Menschen	81
3.2.1.	Gewinnung des Ausgangsmaterials	81

3.2.2.	Präparative Aufarbeitung des Milzgewebes	82
3.2.3.	Gewinnung des Rohhomogenats	82
3.2.4.	Fällung des Hämoglobins nach der Tsuchihashi-Methode	83
3.2.5.	Hämoglobinbestimmung	83
3.2.6.	Salzfällung	84
3.2.7.	Acetonfällung	86
3.2.8.	Kationenaustauschchromatographie im diskontinuierlichen Verfahren (Batch-Verfahren)	86
3.2.9.	Gelfiltrationschromatographie	92
3.2.10.	Anionenaustauschchromatographie	97
3.2.11.	Reinigungstabellen	103
3.2.12.	Reinigungsgele	106
3.3.	Analytische Untersuchungen mit den gerei- nigten Cu/Zn Superoxiddismutasen aus Nor- mal-Milz und Lymphom-Milz des Menschen	108
3.3.1.	Auftrennung der Cu/Zn Superoxiddismutasen durch isoelektrische Fokussierung	108
3.3.2.	Auftrennung der Cu/Zn Superoxiddismutasen durch Polyacrylamid Diskgelelektrophorese	112
3.3.3.	Auftrennung der Cu/Zn Superoxiddismutasen durch zweidimensionale Polyacrylamid Gel- elektrophorese	113
3.3.4.	Molekulargewicht	116
3.3.5.	Metallgehaltsanalyse	119
3.3.6.	Pulsradiolyse	121
3.3.7.	Immunologische Untersuchungen mit gerei- nigter Cu/Zn Superoxiddismutase aus Human- Milzgewebe	124
4.	D I S K U S S I O N	129
4.1.	Superoxiddismutase-Gesamtaktivität in Leukocyten gesunder Spender und an Lymphom erkrankter Patienten	130

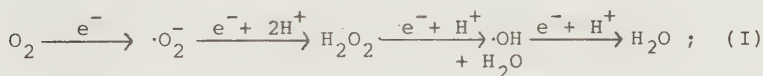
4.2.	Cu/Zn Superoxiddismutase aus normaler Milz und Lymphom-Milz des Menschen	132
5.	Z U S A M M E N F A S S U N G	139
6.	L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S	141

1. EINLEITUNG

Von der zunehmenden Freisetzung molekularen Sauerstoffs (O_2) in die Biosphäre durch Blau-grüne Algen, welche als erste Organismen die Fähigkeit zur Photosynthese besaßen, ging ein starker Evolutionsdruck auf Prokaryonten aus (35, 102). Die sie gefährdende toxische Potenz des sich im Rahmen der Photosynthese anhäufenden Nebenprodukts O_2 bestand in dem unkontrollierten oxidativen Abbau von organischen Molekülen zu CO_2 , N_2 und H_2O . Um ein Überleben in Gegenwart von molekularem Sauerstoff zu gewährleisten, war die Entwicklung von Schutzmechanismen notwendig.

1.1. Biologische Quellen für Sauerstoffradikale

In biologischen Systemen erfolgt der kontrollierte Abbau von molekularem Sauerstoff durch dessen vollständige Reduktion zu Wasser; H_2O entsteht dabei durch die Übertragung von 4 Elektronen auf jedes Sauerstoffmolekül (33):



Im Verlauf dieser monovalenten, stufenweisen Reduktion des Sauerstoffs werden freie Radikale (freies Radikal: Atom, Atomgruppe oder Molekül mit einem ungepaarten Elektron auf einem äußeren Orbital) als sehr reaktive und deshalb toxische Zwischenprodukte gebildet, von denen das Hydroxylradikal ($\cdot OH$) die in höchstem

Maße toxische Spezies darstellt (25). Ihre Entstehung muß aufgrund neuerer Untersuchungsergebnisse (38,70) im Zusammenhang mit einer "Katalysierten Haber-Weiss Reaktion" gesehen werden. Dabei wirken Metallkomplexe (z. B. komplex gebundenes Eisen) als Redox-Katalysatoren:



Da das Superoxidradikal, $\cdot\text{O}_2^-$, sowohl die Reduktionsäquivalente für den oxidierten Eisenkomplex (II) liefert, als auch durch spontane Dismutation zur Entstehung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) führt, kann seine Bildung als eine der Voraussetzungen für die Generierung von Hydroxylradikalen in biologischen Systemen betrachtet werden. Als Quellen für Superoxidradikale in vivo sind u. a. die monovalente Sauerstoffreduktion durch Xanthinoxidase (32, 88), Flavindehydrogenasen (31, 110), Peroxidasen (37), die mitochondriale Atmung (14, 23, 110) sowie die Autooxidation vieler biologischer Verbindungen wie Katecholamine (20) und Flavine (76, 77) bekannt.

1.2. Biologische Funktion und Vorkommen der Superoxid-dismutasen

Dem Schutz vor toxischen Wirkungen der Superoxidradikale und insbesondere der aus ihnen hervorgehenden Folgeprodukte diente die phylogenetisch frühe Ausstattung der Organismen mit Superoxiddismutasen.

Bereits primitive, obligat anaerobe Prokaryonten verfügen über dieses Enzym (41).

Superoxiddismutasen katalysieren die Disproportionierung (= Dismutierung) von Superoxidradikalen nach folgender Gleichung:



Diese bei pH 7,0 bereits spontan (Geschwindigkeitskonstante $k = 10^6 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$) ablaufende Reaktion wird durch Superoxiddismutasen noch um einen Faktor von etwa 1000 beschleunigt ($k \approx 10^9 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$) und gehört damit zu den schnellsten bisher bekannten enzymatisch katalysierten Reaktionen (95).

Sie muß in einem sinnvollen Zusammenhang mit dem weiteren Abbau des entstehenden H_2O_2 (Gl.(IV)) durch Peroxidasen und Katalase gesehen werden.

Mc Cord und Fridovich (71) entdeckten im Jahre 1969 die enzymatische Funktion eines erstmals 1939 von Mann und Keilin (65) aus Erythrocyten isolierten, kupferhaltigen und deshalb Erythrocytuprein genannten Proteins. Die Funktion des mittlerweile in vielen Geweben nachgewiesenen und in seiner Struktur untersuchten Proteins (7, 18, 39, 40, 49, 104) bestand in der Katalyse der Dismutierung von Superoxidradikalen. Das gab den Anlaß, Erythrocytuprein mit der spezifischen, seiner biologischen Funktion Rechnung tragenden Bezeichnung Superoxiddismutase zu belegen. Da dieses Enzym ein dimeres Metallprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 33000 Dalton (39) darstellt, dessen Momomere je 1 mol Cu und Zn enthalten, kann es als Cu_2/Zn_2 Superoxiddismutase bezeichnet werden. Nach dem bisherigen Stand der Forschung beschränkt sich sein Vorkommen mit einer Ausnahme (89) auf das Cytoplasma von Eukaryonten.

Eine weitere, im Zusammenhang mit phylogenetischen Aspekten sehr interessante Gruppe der Superoxiddismutasen besitzt das

Metall Mangan in seinem aktiven Zentrum. Mn Superoxiddismutase wurde sowohl in Prokaryonten als auch in Eukaryonten - hier hauptsächlich in Mitochondrien - gefunden.

SUPEROXIDDISMUTASE (MENSCH)

	Metall	Untereinheiten	MW	Vork.
SOD A	Cu/Zn	2	≈ 33000	Zytoplasma
SOD B	Mn	4	≈ 80000	Mitochondrien (Zytoplasma)

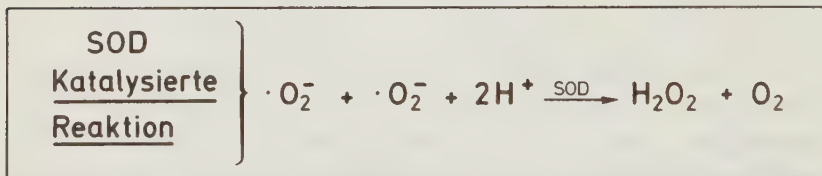


Abb. 1 : Superoxiddismutasen (SOD) in menschlichen Zellen.
Katalytische Funktion der Enzyme

Als phylogenetisch älteste Variante ist die mit einer Ausnahme (97) nur in Prokaryonten vorkommende Eisen-haltige Superoxiddismutase anzusehen.

Zellen von aeroben Organismen sind mit relativ hoher Konzentration an Superoxiddismutasen ausgestattet. So besitzen z. B.

Human-Erythrocyten das Kupfer-haltige Enzym in einer Konzentration von 10^{-5} Molar.

Ihr ubiquitäres Vorkommen in Organismen - obligate Anaerobier eingeschlossen - spiegelt die Bedeutung der Superoxiddismutasen im Rahmen der Evolution wider.

1.3. Klinisch-pathophysiologische Gesichtspunkte

Die biologische Aufgabe der Superoxiddismutasen scheint darin zu bestehen, die Gleichgewichtskonzentration ("steady state level") des Superoxidradikals in Zellen niedrig zu halten. Unter solchen kontrollierten Bedingungen kann die notwendige Beteiligung von Superoxidradikalen an enzymatisch katalysierten Syntheseprozessen stattfinden (62, 85, 86), ohne die Zelle in ihrer biologischen Funktion zu gefährden. Die Produktion von Superoxidradikalen und deren reaktiver Folgeprodukte wird als wichtiger bakterizider Mechanismus in phagocytierenden Granulocyten angesehen (2, 3, 5, 34, 47, 48, 73, 79, 92, 93, 101). Granulocyten der an Wegener'scher Granulomatose erkrankten Patienten haben weitgehend die Fähigkeit zur Bildung dieser Radikale verloren (21, 47, 106).

Bei einer Reihe pathologischer Geschehen ist ein Zusammenhang zwischen der Schädigung zellulärer Strukturen und unkontrollierter Sauerstoffradikalbildung anzunehmen (10, 30, 46, 50, 56, 57, 61, 73, 74, 78, 94, 98, 99, 107, 108, 114). Erkenntnisse über die Rolle von Sauerstoffradikalen in inflammatorischen Prozessen führten zum Einsatz von Superoxiddismutase als Medikament zur Therapie rheumatischer Entzündungen (68, 75, 90).

Einen wichtigen Aspekt der toxischen Potenz stellt der Reaktionsweg bestimmter aktivierter Sauerstoffspezies mit Nukleinsäuren dar. Im Rahmen der Mutationsforschung und der Carcinogenese ist dies in neuerer Zeit berücksichtigt worden (10, 61, 78,

94, 108, 118). Strahlenbiologisch ist der sogenannte Sauerstoffeffekt (80) bei der Strahlentherapie bösartiger Geschwülste bekannt. Dabei wird für die beobachtete höhere Strahlensensibilität euoxischer Gewebe eine erhöhte Sauerstoffradikalkonzentration in den Zellen angenommen.

1.4. Engere Problemstellung

Die dargestellte allgemeine Bedeutung von Sauerstoffradikalen und die kurz geschilderte Funktion der Superoxiddismutasen in der Zelle führte in den letzten Jahren zu einem gesteigerten wissenschaftlichen Interesse an der Bildung von Sauerstoffradikalen und der Aktivität von Superoxiddismutase in bösartigen Tumoren (8-10, 13, 24, 43-45, 82, 87, 94, 108, 117). Quantitative und qualitative Messungen in entsprechenden Gewebshomogenaten zeigten gegenüber gesunden Geweben meist erniedrigte Cu/Zn Superoxiddismutase-Aktivität (8, 66, 81, 82, 87, 96, 117) und wiesen auf ein Fehlen der Mn Superoxiddismutase in malignen Zellen hin (24, 43-45, 81, 96, 118).

Demgegenüber stellt die Reinigung des Cu/Zn Enzyms aus gesundem und maligne entartetem Gewebe des Menschen die Voraussetzung für die Durchführung spezieller Untersuchungen dar, die eine Beurteilung der katalytischen Eigenschaften des Enzyms erlauben. Die Aufgabe der hier vorliegenden Arbeit bestand darin, erstmals Cu/Zn Superoxiddismutase aus Normal-Milz des Menschen zu isolieren und das Enzym durch spezielle analytische Methoden zu charakterisieren. Anschließend sollte vergleichsweise Cu/Zn Superoxiddismutase aus der Milz eines Patienten mit malignem Lymphom isoliert werden. Die aus menschlicher Lymphom-Milz isolierte Cu/Zn Superoxiddismutase (43) mit einer deutlich niedrigeren Geschwindigkeitskonstante gegenüber der gereinigten

Cu/Zn Superoxiddismutase aus Rindermilz (43) sollte mit den gereinigten Endprodukten der hier durchgeführten Isolierungen verglichen werden und in Erweiterung der früheren Arbeiten einen direkten Vergleich von species-identischer Cu/Zn Superoxiddismutase aus normalem und malignem Gewebe ermöglichen.

Eine weitere Aufgabenstellung im Rahmen der vorliegenden Arbeit beinhaltete die vergleichende quantitative Bestimmung der Superoxiddismutase-Aktivität in Rohhomogenat-Überständen von aus dem peripheren Blut gesunder Spender und Patienten mit malignem Lymphom isolierten Lymphocyten und Granulocyten.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Geräte

Amicon, Witten	Ultrafiltrationsgerät Modell 12 Diafiltrationsapparatur Modell CDS 10
Beckman, München	Spektralphotometer M 35 Ultrazentrifugen-Rotor TI 75
Braun, München	Frigo Mix
Branson, USA	Sonifier B 12
Desaga, Heidelberg	Elektrophoreseapparatur Leuchtschirm
Du Pont, USA	Sorvall RC-5 Zentrifuge
Heraeus Christ, Osterode	Cryofuge 6-6
Fa. Hölzl, Dorfen	Flachgel-Elektrophoresekammer

Instrum. Lab./USA	Atomabsorptions- Spektrophotometer
	Hohlkathodenlampen für Kupfer und Zink
Kontron, München	Ultrazentrifuge TGA-65
LKB Prod., Bromma, Schweden	2117 Multiphor mit Stromspannungsgerät Fraktionssammler Ultrorac 7000 mit Uvicord
Original Hanau	UV-Licht-Bestrahlungs- anlage Fluotest
Pharmacia, Freiburg	Peristaltic Pump P 1 Chromatographiesäulen K9/15, K16/40, K26/70, K50/100
Sartorius, Göttingen	elektrische Waage
WTW, Weilheim	pH-Meter pH DIGI 520 Konduktometer LF 42

2.2. Chemikalien und Reagenzien

Behring, Marburg	Rinderalbumin-Standard
Boehringer, Mannheim	Riboflavin Xanthinoxidase Kat. Nr. 110434
Deutsche Pharmacia, Freiburg	Density Marker Beads Percoll Dichtegradientenzentri- fugationsmedium Pharmalyte (pH 4,0 - 6,5) Sephadex CM-50 Sephadex DEAE A-50 Sephadex G-25 Sephadex G-75
Diagnostic Data Lab., USA	Cu/Zn Superoxiddismutase aus Rindererythrocyten
Merz und Dade AHS, Deutschland	Diff-Quik Fixier- u. Färbe- lösungen
Serva, Heidelberg	Acrylamid Bisacrylamid Bromphenolblau Coomassie Brilliant Blau R 250 Molekulargewichtsmarker Kat. Nr. 29064 (29000 - 170000 Dalton) Natriumdodecylsulfat (SDS) Nitrotetrazoliumblau (NBT) Protein-Testmischung 9 für Polyacrylamidgele Tetramethyläthylendiämin (Temed) Trypanblau

Sigma, Taufkirchen	Cytochrom c aus Pferdeherz
	Hämoglobin-Testkit
	Xanthin

Apotheke der klini- schen Universitäts- Anstalten, München	Ficoll-Isopaque-Lösung
	Dextran 250000 3%

Die sonst benutzten Substanzen wurden von Merck, Darmstadt bezogen.

Das verwendete Wasser war deionisiert und quarzdestilliert, das für die Pulsradiolyse verwendete Wasser war dreimal destilliert und pyrrolisiert.

2.3. Methoden

2.3.1. Allgemeine Methoden

2.3.1.1. Proteinnachweis durch direkte Messung bei $A_{280\text{nm}}$

Proteinlösungen lassen sich qualitativ und semiquantitativ nachweisen, indem die Absorption im UV-Bereich ($A_{280\text{ nm}}$) gegen Wasser oder Puffer in Quarzküvetten gemessen wird. Bei dieser Wellenlänge absorbieren nur die aromatischen Aminosäuren. Der relative Anteil dieser Aminosäuren am Gesamtprotein ist die Meßgröße.

2.3.1.2. Quantitative Proteinbestimmung nach Lowry (64)

Die Bestimmung ($A_{578\text{ nm}}$) basiert auf zwei chemischen Reaktionen:

- a) Entstehung eines farbigen Kupferkomplexes mit den Peptidbindungen des Proteins.
- b) Reduktion von Phosphorwolframsäure und Phosphormolybdän (= Folin-Ciocalteus-Reagenz) durch die aromatischen Aminosäuren des Proteins.

Die Empfindlichkeit des Testverfahrens erlaubt eine reproduzierbare quantitative Proteinbestimmung in einem Bereich von 30 - 200 μg Protein/ml Lösung.

Testsubstanzen (vor jeder Bestimmung frisch herzustellen):

- | | |
|-------------------------------|--|
| 1) Albumin-Standardlösung: | 25 mg Rinderserumalbumin |
| in | 25 ml Aqua bidest. |
| | |
| 2) Natriumcarbonat-/Kalium- | 2 g Na_2CO_3 |
| natriumtartrat-Lösung: | 20 mg $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$ |
| | <hr/> |
| ad | 100 ml 0,1N NaOH |
| | |
| 3) Kupfersulfat-Lösung (0,2%) | 50 mg $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$ |
| in | 10 ml Aqua bidest. |
| | |
| 4) Reagenz nach Folin-Ciocal- | |
| teus (Fa. Merck, Darmstadt) | |
| | |
| I) Mischung A | 50 ml Lösung (2) |
| | 1 ml Lösung (3) |
| | |
| II) Mischung B | 5 ml Lösung (4) |
| | 9 ml Aqua bidest. |

Bestimmungsansatz (Doppelbestimmung):

Meßstrahlung: Hg 578 nm; Schichtdicke: 1 cm;

Testvolumen: 6,5 ml; Raumtemperatur.

In Reagenzgläser pipettieren:	Leerwert (ml)	Standard (ml)				Probe (ml)
Wasser	1,00	0,975	0,95	0,90	0,85	-
Serumalbumin (I)	-	0,025	0,05	0,10	0,15	-
Probe	-	-	-	-	-	1,00
Mischung A (I)	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00

mischen, genau 10 min bei Raumtemperatur inkubieren,

Mischung B (II)	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
-----------------	------	------	------	------	------	------

mischen, 30 min bei Raumtemperatur stehenlassen; dann Extinktionen der Probe und des Standards gegen Extinktion des Leerwertes messen.

Aus den ermittelten Extinktionen für die 4 Standardverdünnungen wird eine Eichgerade errechnet und auf Millimeterpapier gezeichnet. Die Proteinkonzentration wird über diese Standard-Eichgerade bestimmt. Bei den jeweiligen Proteinbestimmungen an verschiedenen Tagen werden die Standards mitgeführt und mit der Eichgeraden verglichen.

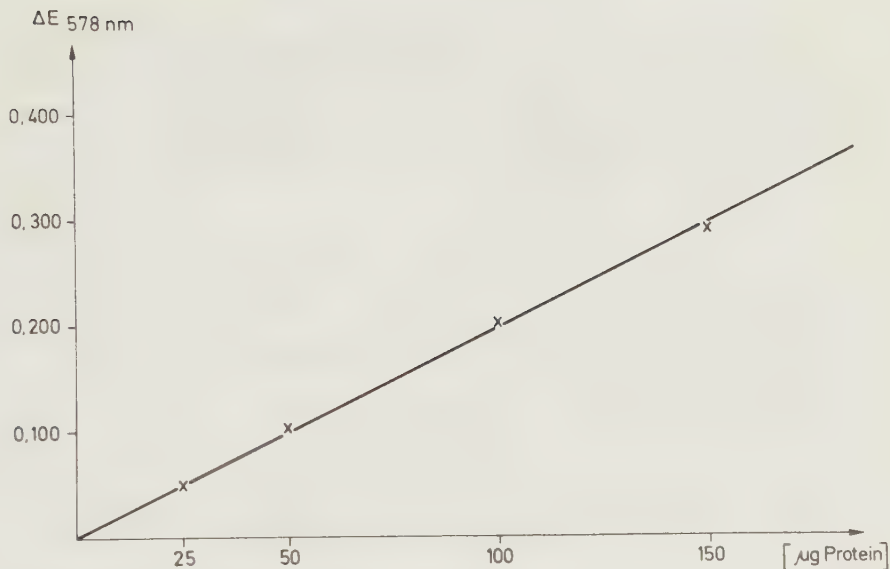


Abb. 2 : Eichgerade zur Bestimmung der Proteinkonzentration nach der Methode von Lowry (64). Zur Erstellung der Eichgeraden dienten vier Standards, die aus einer Rinderserumalbumin-Standardlösung (BSA: 1 mg/ml) hergestellt wurden. Als Leerwert wurde eine Probe ohne BSA verwendet.

Testvolumen: 6,5 ml.

Abszisse: eingesetzte Menge des BSA-Standards ($\mu\text{g Protein}$)

Ordinate: $\Delta E_{578 \text{ nm}}$ des BSA-Standards gegen Leerwert
gemessen, Schichtdicke 1 cm.

Korrelation: 0,998

2.3.1.3. Bestimmung der Proteinkonzentration gereinigter Cu/Zn Superoxiddismutase über deren molaren Absorptionskoeffizienten

Es wird die Extinktion der gelösten Cu/Zn Superoxiddismutase bei einer charakteristischen Wellenlänge (Quarzküvette, Schichtdicke 1 cm) gegen das Lösungsmittel als Leerwert gemessen.

Die Auswertung folgt dem Lambert-Beer'schen Gesetz:

$$c = \frac{E}{\epsilon \times d} ;$$

c = Proteinkonzentration (mol/l)

E = gemessene Extinktion bei 266 nm (Humanenzym)

d = Schichtdicke (cm)

ϵ = molarer Absorptionskoeffizient ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

Der molare Absorptionskoeffizient beträgt:

18700 bei der humanen Cu/Zn Superoxiddismutase (104)

Mit Hilfe des Molekulargewichts wird auf die Proteinkonzentration (mg/ml) der Lösung umgerechnet.

2.3.1.4. Hämoglobinbestimmung (111)

Prinzip:

Kaliumferricyanid oxidiert Fe^{2+} - Hämoglobin zu Fe^{3+} - Hämglobin, welches mit Kaliumcyanid unter Bildung von Fe^{3+} - Hämglobincyanid reagiert. Diese stabile Verbindung wird bei $A_{540 \text{ nm}}$ photometrisch gemessen. Der Extinktionsverlauf ist linear abhängig von der Hämoglobinkonzentration.

Bestimmungsansatz (Doppelbestimmung)

Methämoglobin-Stand.lsg.

(g/100 ml)

	Leerwert	6,0	12,0	18,0	Probe
Methämoglobin- Standard-Lösung	---	2,0 ml	4,0 ml	6,0 ml	---
Drabkin'sche Lösung	6,0 ml	4,0 ml	2,0 ml	---	5,0 ml
Probe	---	---	---	---	20 μ l

mischen, 30 min bei Raumtemperatur stehenlassen

Durchführung:

Die Bestimmung der Hb-Konzentration einer Probelösung erfolgt über eine Eichgerade, die aus einer Verdünnungsreihe einer Methämoglobin-Standardlösung erstellt wird. Die Standardverdünnungen und der Leerwert-Ansatz werden mit Drabkin'scher Lösung hergestellt. Die Eichlösungen werden bei $A_{540\text{ nm}}$ gegen den Leerwert gemessen. Bei jeder Hb-Bestimmung in Probelösungen werden der Leerwert und die Original-Standardlösung zur Kontrolle mitgemessen.

Für die Hb-Bestimmung in Probelösungen werden zu je 5,0 ml Drabkin'scher Lösung 20 μ l Probelösung (Vollblut bzw. Isolierungsproben) zugegeben, gut gemischt und 30 min bei Zimmertemperatur zur Inkubation stengelassen. Die Messung erfolgt bei $A_{540\text{ nm}}$ gegen den Leerwert (Drabkin'sche Lösung). Anschließend wird die Häoglobinkonzentration rechnerisch über die Eichgerade ermittelt.

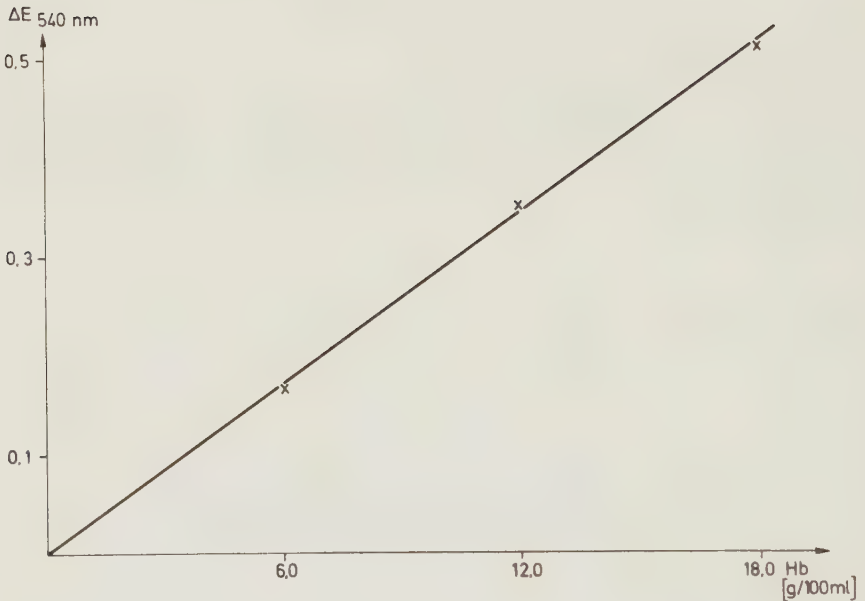


Abb. 3 : Eichgerade zur Bestimmung der Hämoglobinkonzentration nach der Hämiglobincyanid-Methode (111).

Zur Erstellung der Eichgerade dienten Cyanmethämoglobin-Standardlösungen (18 g Hb / 100 ml, 12 g Hb / 100 ml, 6 g Hb / 100 ml).

Abszisse: Eingesetzte Menge des Cyanmethämoglobin-Standards (g Hb / 100 ml).

Ordinate: $\Delta E_{540 \text{ nm}}$ des Standards gegen Leerwert (Drabkin'sche Lösung) gemessen, Schichtdicke 1 cm.

Korrelation: 0,998.

2.3.1.5. Konduktometrie

Mit dem Verfahren der Konduktometrie (Messung der elektrischen Leitfähigkeit) ist es möglich, über den ionalen Ladungstransport mittels einer speziellen Elektrode ein Maß für die Ionenstärke eines Elektrolyten (z. B. Pufferlösung) zu erhalten.

Zu beachten ist dabei, daß das Leitvermögen stark temperaturabhängig ist (Temperaturkoeffizient 1 - 3 % pro °C). Ein spezieller Temperaturmeßfühler ermöglicht eine automatische Temperaturkompensation. Die in dieser Arbeit vorgelegten Leitfähigkeitsmessungen von gepufferten Salzlösungen erfolgten unter Temperaturkontrolle (Gerät LF 42 der Firma WTW, Weilheim).

2.3.1.6. Dialyse

Durch Zwischenschalten einer Porenmembran, die infolge ihrer geringen Porengröße für kolloide Teilchen nicht mehr durchlässig ist, zwischen zwei Flüssigkeiten mit unterschiedlichen Ionenkonzentrationen, erfolgt - dem Prinzip der Diffusion entsprechend - ein Konzentrationsausgleich durch Wanderung der Ionen und der molekulardispers gelösten Teilchen in Richtung des Konzentrationsgefälles. Die kolloiden Teilchen (z. B. Proteine) werden von der Dialysemembran zurückgehalten.

Auf diese Weise läßt sich die Ionenkonzentration einer Flüssigkeit einstellen.

Die bei der hier vorliegenden Arbeit verwendete Dialysemembran hatte eine Ausschlußgrenze von 20000 Dalton.

2.3.1.7. Ultrafiltration

Das Verfahren der Ultrafiltration ermöglicht die Konzentration dispers gelöster Teilchen durch Abpressen des Dispersionsmittels, in dem sie gelöst sind.

In eine luftdicht und überdruckfest verschlossene Ultrafiltrationskammer, welche mit der zu filtrierenden Probelösung gefüllt ist, wird ein träges Gas (z. B. Stickstoff) über ein Überdruckventil mit einem Druck bis zu 5 bar eingeleitet.

Zwischen Flüssigkeit und Kammerauslauf ist eine Porenmembran geschaltet, deren Porengröße entsprechend dem Molekulargewicht der zu konzentrierenden Substanz gewählt wird. Auf diese Weise kann das Dispersionsmittel abfließen, während die kolloiden Teile (z. B. Proteine) mit einem Molekulargewicht, welches höher liegt als die Ausschlußgrenze der Ultrafiltrationsmembran, zurückgehalten werden.

2.3.1.8. Diafiltration

Dieses Verfahren ermöglicht die Veränderung der Ionenkonzentration einer Probelösung innerhalb kurzer Zeit.

Es basiert auf der Technik der Ultrafiltration. Zusätzlich wird durch eine gesonderte Zuleitung, die mit einem in das Überdrucksystem integrierten Flüssigkeitsreservoir verbunden ist, der Flüssigkeitsspiegel in der Ultrafiltrationskammer konstant gehalten. Auf diese Weise wird so lange diafiltriert, bis die Ionenkonzentration der Probelösung in der Ultrafiltrationskammer gleich der der Reservoirflüssigkeit ist. Das Gesamtvolumen, welches dazu aus dem Reservoir über die Ultrafiltrationskammer laufen muß (Diafiltrationsvolumen), berechnet sich folgendermaßen:

$$Dv = \ln \frac{M_A}{M_E} \times Av$$

Dv = Diafiltrationsvolumen

Av = Ausgangsvolumen der zu diafiltrierenden Probelösung

M_A = Molarität der Probelösung vor Diafiltration

M_E = Molarität der Reservoirflüssigkeit (= gewünschte Molarität der Probelösung nach Diafiltration)

2.3.2. Präparation von Lymphocyten und Granulocyten aus menschlichem Vollblut

Der hier dargestellten, modifizierten Präparation wurden die Angaben der Methoden von Boyum (15) und Höfer (42) zugrunde gelegt.

2.3.2.1. Prinzip

Der Trenneffekt der Methode basiert auf der unterschiedlichen Dichte der einzelnen Zellpopulationen.

Die durch hochmolekulares Dextran zu einem großen Teil von den Erythrocyten abgetrennten Lymphocyten werden über ein Trennmedium mit fester Dichte von 1,077g/ml (hochmolekulare Polysaccharide und Diatrizoat-Salze) geschichtet und zentrifugiert. Die Zellen mit höherer Dichte (Erythrocyten und Granulocyten) - am Boden des Zentrifugenröhrchens - und die Lymphocyten (sowie vereinzelt Monocyten) an der Grenzschicht beider Phasen werden danach jeweils getrennt über einen vorgefertigten sigmoiden

Dichtegradienten (1,0 - 1,12 g/ml; mittlere Dichte 1,087 g/ml) geschichtet und nochmals zentrifugiert. Die Lymphocyten bilden hierbei an der Oberfläche des Gradienten eine Schicht, die Granulocyten liegen im oberen Drittel des Gradienten, die Erythrocyten im unteren Drittel. Auf diese Weise erhält man bezüglich der Erythrocytenverunreinigung eine saubere Isolierung von Lymphocyten und Granulocyten mit einer hohen Zellvitalität und Ausbeute. Dies ist im Hinblick auf eine spezifische Aktivitätsbestimmung in den einzelnen Zellpopulationen notwendig.

Durch entsprechende Vorversuche mit "Density-Marker-Beads" (Dichte 1,048 - 1,097 g/ml) wurde ein Percoll-Gradient hergestellt, in welchem die zu trennenden Blutzellen möglichst weit auseinander lagen. Dazu wurden bei verschiedenen Ausgangsdichten von Percoll die Umdrehungszahl des Ultrazentrifugenrotors (TI 75) und die Zentrifugationsdauer so gewählt, daß im Bereich der zu isolierenden Zellpopulationen ein geringer Dichte-Unterschied zu relativ großen Abständen führte, d.h. ein möglichst steiler sigmoider Dichtegradient vorlag.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Versuchsbedingungen festgesetzt:

Percoll-Ausgangsdichte: 1,087 g/ml (Percoll, Fa. Pharmacia Fine Chemicals)

Rotor-Umdrehungszahl: 20000 RPM = 27000g (Festwinkel-Rotor TI 75, Fa. Beckman; Ultrazentrifuge TGA-65, Fa. Kontron)

Zentrifugationsdauer: 15 Minuten, ohne Bremse, Temp. 4 °C

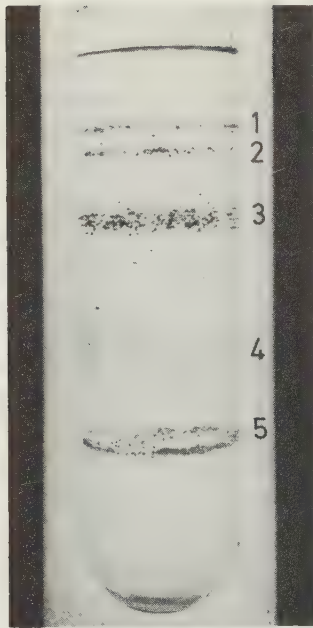


Abb. 4 : Darstellung des zur Präparation von Lymphocyten und Granulocyten aus peripherem Venenblut verwendeten Percoll-Dichtegradienten durch Teilchen (Density Marker Beads, Fa. Pharmacia), die sich entsprechend ihrer unterschiedlichen Dichte im Gradienten anordnen.

Es wurden jeweils ca. 20 μ l Teilchen-Suspension auf den im Text beschriebenen Gradienten aufgetragen.

Zentrifugation 20 min mit 150 - 200 g (= 800 - 900 RPM; Cryofuge 6-6, Fa. Heraeus Christ; Ausschwingrotor)

Bande 1: 1,048 g/ml	Bande 4: 1,087 g/ml
Bande 2: 1,062 g/ml	Bande 5: 1,097 g/ml
Bande 3: 1,075 g/ml	

2.3.2.2. Durchführung der Präparation

40 ml EDTA-Blut (1 Vol.-Teil EDTA, gelöst in 0,9% NaCl, Konzentration 20 mg/ml + 9 Teile Vollblut) werden aus der gestauten Armvene entnommen. Eine Probe (3 ml) zur Bestimmung des Hämoglobingehalts (g/100 ml), der Erythrocyten- und Leukocytenzahl sowie für die Anfertigung eines Differentialblutbildes wird getrennt abgenommen. Das Blut wird in einen 250 ml-Meßzylinder gefüllt, mit 1 Vol.-Teil physiologischer NaCl- und 3 Vol.-Teilen Dextranlösung (3% Dextran 250000 in 0,9% NaCl) gemischt und 35 Minuten bei 37 °C zur Sedimentation stehengelassen.

Der hellrot - trübe Überstand (ca. 180 ml) wird vom Erythrocyten-Sediment abgehebert und bei 20 °C 20 Minuten lang mit 950 g (= 2000 RPM; Cryofuge 6-6, Fa. Heraeus Christ; Ausschwingrotor) zentrifugiert. Der Niederschlag wird mit 75 ml physiologischer NaCl-Lösung resuspendiert. Je 12,5 ml dieser Suspension werden vorsichtig über 7,5 ml Ficoll-Trennmedium (Dichte = 1,077 g/ml) geschichtet, so daß keine Vermischung der beiden Phasen stattfindet. Es folgt eine 20-minütige Zentrifugation ohne Bremse mit 950 g (= 2000 RPM; Cryofuge 6-6, Fa. Heraeus Christ; Ausschwingrotor) bei 20 °C.

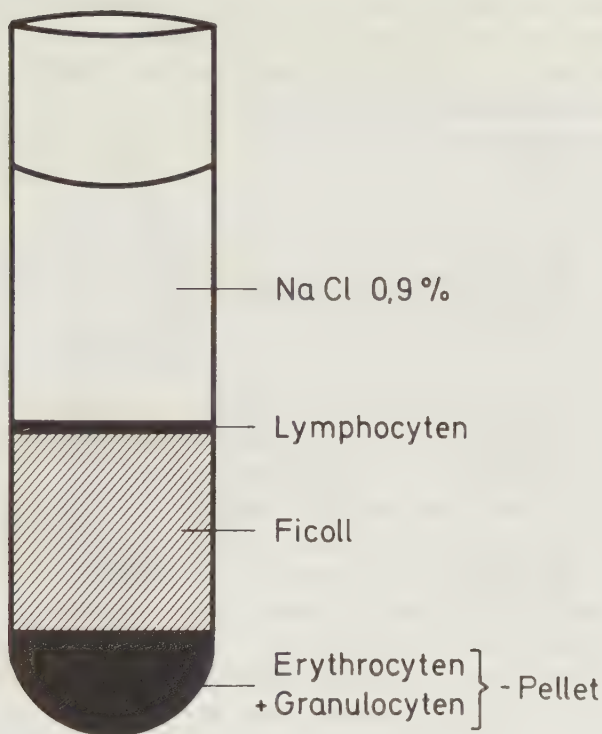


Abb. 5 : Erklärung siehe Text

Die Lymphocytenschicht wird vorsichtig mit einer Pasteur-Pipette abgehebert und gesammelt. Dabei wird vermieden, zuviel Ficoll-Trennmedium mit abzunehmen.

Der restliche Überstand wird abgesaugt und verworfen. Der Niederschlag aus Erythrocyten und Granulocyten wird mit insgesamt 100 ml physiologischer NaCl-Lösung resuspendiert und 15 min bei 20 °C mit 750 g (= 1800 RPM; Cryofuge 6-6, Fa. Heraeus Christ; Ausschwingrotor) zentrifugiert. Der Niederschlag wird mit physiologischer NaCl-Lösung auf ein Gesamtvolumen von 3 ml resuspendiert.

Die Lymphocyten-reiche Phase wird mit 0,9% NaCl-Lösung auf ein Gesamtvolumen von 50 ml aufgefüllt, gut resuspendiert und ebenfalls 15 min bei 20 °C mit 750 g zentrifugiert. Der Niederschlag wird auf ein Gesamtvolumen von 500 µl (bei hoher Lymphocytenzahl 1 - 2 ml) resuspendiert.

2.3.2.3. Herstellung eines Percoll-Dichtegradienten mit mittlerer Dichte von 1,087 g/ml

Von der Percoll-Originallösung (Dichte = 1,130 g/ml) wird als isoosmotische Stammlösung eine Verdünnung im Verhältnis 9 Teile Percoll + 1 Teil 1,5 M NaCl-Lösung hergestellt.

Zur Dichtegradientenzentrifugation werden 48 ml dieser Stammlösung mit 21 ml 0,9% NaCl-Lösung verdünnt. Daraus ergibt sich eine Lösung der Dichte 1,087 g/ml.

Acht Polycarbonat-Ultrazentrifugenröhrchen werden mit je 8 ml dieser Percoll-Mischung gefüllt und 20 min lang bei 4 °C mit 27000g (= 20000 RPM; Ultrazentrifuge TGA-65, Fa. Kontron; Festwinkelrotor TI 75, Fa. Beckman) ohne Bremse zentrifugiert. Der Überstand (ca. 1 ml) über dem gebildeten Dichtegradienten wird abgehebert.

2.3.2.4. Zelltrennung über einen Percoll-Dichtegradienten

Auf jeden der acht Gradienten werden maximal 400 µl der Granulocyten-reichen bzw. Lymphocyten-reichen Phase vorsichtig mit einer Pasteur-Pipette aufgetragen. Um eine Verteilung der Zellen gemäß ihrer unterschiedlichen Dichte zu erreichen, folgt eine 20-minütige Zentrifugation bei 15 °C mit 150 - 200 g (= 800 bis 900 RPM; Cryofuge 6-6, Fa. Heraeus Christ; Ausschwingrotor) ohne Bremse.

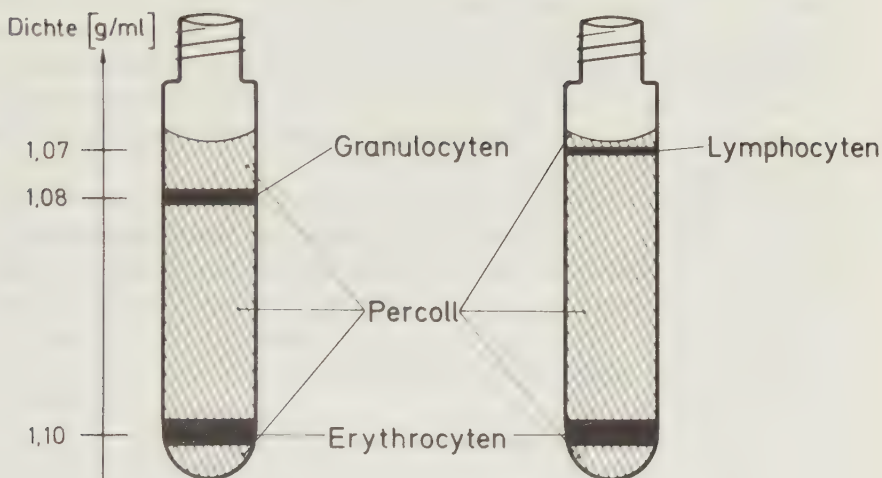


Abb 6 : Erklärung siehe Text.

Die Granulocyten bzw. Lymphocyten werden abgehebert, mit reichlich physiologischer NaCl-Lösung (ca. 10-faches Volumen der Zell-Percoll-Suspension) gemischt und 10 min lang bei 15 °C mit 600 g (= 1600 RPM; Cryofuge 6-6, Fa. Heraeus Christ; Ausschwingrotor) zentrifugiert. Der Zell-Niederschlag wird nach Abkippen des Überstandes mit Kochsalzlösung (0,9%) resuspendiert. Die Zellzahl pro ml wird in einer Zählkammer mikroskopisch bestimmt und auf eine Konzentration von $2 - 5 \times 10^7$ Zellen/ml mit 0,9% NaCl eingestellt.

2.3.2.5. Aufbereitung der Zellfraktionen

Nach der Präparation der Granulocyten und Lymphocyten wird das Hämoglobin in den isolierten Zellfraktionen bestimmt (siehe Methode 2.3.1.4.). Die Reinheit der jeweiligen Zelltrennung wird mikroskopisch mittels eines gefärbten Ausstrichs festgestellt. Dieser wird zur Schonung der Zellen vorsichtig mit einem zuvor in fötalem Kälberserum getränkten, feinen Haarpinsel auf einem Objektträger ausgeführt.

Die Messung des Hämoglobins nach der Präparation ist ein Anhalt für die Verunreinigung der Zellpräparation durch Erythrocyten. Der gefärbte Ausstrich nach der Isolierung ermöglicht eine morphologische Beurteilung der Zellen. Ca. 1 Stunde nach der Präparation wird eine Vitalfärbung mit Trypanblau durchgeführt, um die Intaktheit der Zellen zu überprüfen.

Die isolierten Zellsuspensionen werden in Volumina von jeweils 500 - 800 μ l bei einer Sonifikatorleistung von 60 Watt 5 x jeweils 5 sec unter Eiskühlung sonifiziert, wobei zwischen jeder Beschallung eine Pause von 60 sec eingelegt wird, um eine Überwärmung des Sonifikates zu vermeiden.

Eine anschließende mikroskopische Kontrolle läßt erkennen, ob die Zellen vollständig aufgeschlossen wurden.

Der Zelldébris wird bei 4 °C über 10 min mit 11500 g (= 15000 RPM; Zentrifuge Sorvall RC-5, Fa. Du Pont Instr.; Festwinkelrotor SS-34) abzentrifugiert, der Überstand bei -40 °C bis zur Weiterverarbeitung eingefroren. Zuvor wird vom 11500g-Überstand in einer 1:10-Verdünnung mit physiologischer NaCl-Lösung bei $A_{280 \text{ nm}}$ in einer Quarzküvette gegen Wasser die Extinktion bestimmt, um einen Richtwert für die Proteinkonzentration der Lösung zu erhalten.

2.3.3. Isolierung von Cu/Zn Superoxiddismutase

2.3.3.1. Prinzip

Der Isolierung des Enzyms aus Gewebe wurde die Isolierungsmethode von Cu/Zn Superoxiddismutase aus Hühnerleber nach Weisiger und Fridovich zugrundegelegt (113).

Im Prinzip zerfällt der Trennungsgang in zwei Abschnitte. Nach Gewinnung des Rohprodukts durch klassische Methoden wie Aussalzen und Ausfällen der Proteine mit organischen Lösungsmitteln erfolgt im weiteren Trennungsgang die Reinigung des Enzyms durch säulenchromatographische Methoden.

2.3.3.2. Trennungsgang

Nach der Gewinnung des Rohhomogenats wird in Anlehnung an die Tsuchihashi-Fraktionierung (109) das Hämoglobin durch Äthanol/Chloroform (0,25 Vol.-Teile und 0,15 Vol.-Teile) gefällt. Der Chloroform/Äthanol-Überstand wird durch Zugabe von festem K_2HPO_4 in eine obere leichte äthanolische Phase mit der Hauptmenge an Cu/Zn Superoxiddismutase und eine untere schwere wässrige Phase mit der Hauptmenge an Salzen getrennt. Anschließend wird das Rohprodukt mit Aceton (0,8 Vol.-Teile) gefällt und das Protein nach Aufnahme in einem kleinen Volumen Puffer ausgiebig dialysiert.

Zunächst erfolgt eine diskontinuierliche Chromatographie (batch-Verfahren) an Carboxymethyl-Cellulose (Kationenaustauscher), wobei nach Wegwaschen von ungebundenem Protein das vorgereinigte Produkt bei höherer Salzkonzentration eluiert wird. Nach Einengung des Volumens durch Ultrafiltration wird eine Gelfil-

tration über Sephadex G-75 durchgeführt. Die Fraktionen mit Superoxiddismutase-Aktivität werden gepoolt und erneut ultrafiltriert. Im letzten Reinigungsschritt erfolgt eine kontinuierliche Chromatographie an DEAE-Cellulose (Anionenaustauscher). Nach Entsalzen der ultrafiltrierten Endstufe über Sephadex G-25 wird das gereinigte Enzym nach proteinchemischen Gesichtspunkten näher charakterisiert (siehe Spezielle analytische Methoden 2.3.6.).

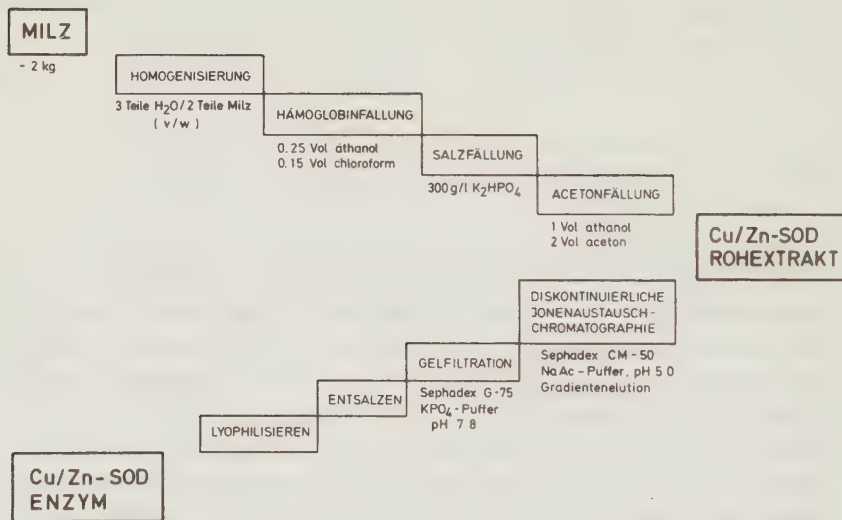


Abb. 7 : Schematische Darstellung des Trennungsganges zur Isolierung von Cu/Zn Superoxiddismutase (SOD) aus lymphatischem Milzgewebe.

2.3.4. Enzymaktivitätsbestimmung der Superoxiddismutase - Indirekte Methode

Zur quantitativen und qualitativen Bestimmung der Enzymaktivität stehen zwei grundsätzlich verschiedene Methoden zur Verfügung.

Indirekte Methode

Bei dieser Methode wird häufig ein chemisches Reaktionssystem verwendet, das im ersten Reaktionsschritt in Anwesenheit von Sauerstoff $\cdot\text{O}_2^-$ -Radikale liefert (Elektronen generierendes System) und in einem zweiten Schritt durch Elektronenübertragung vom $\cdot\text{O}_2^-$ -Radikal einen geeigneten Reaktionspartner reduziert (Elektronen aufnehmendes System). Die Superoxiddismutase konkurriert mit diesem zweiten Reaktionsschritt durch katalytisches Umsetzen der $\cdot\text{O}_2^-$ -Radikale und läßt sich durch die Stärke der Reduktionshemmung quantitativ und qualitativ nachweisen (siehe Abb. 8).

SOD - AKTIVITÄTSBESTIMMUNG

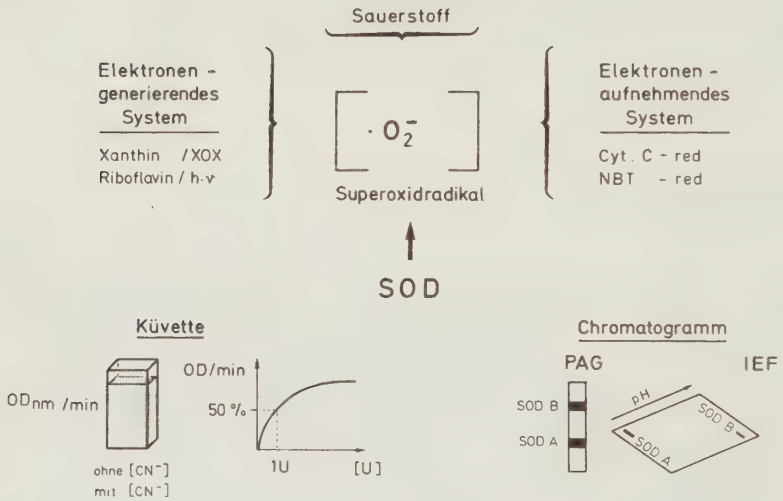


Abb. 8 : Allgemeine Darstellung des Cytochrom c Reduktionshemmtests (Küvettestest, Hemmung der Photoreduktion von Nitrotetrazoliumblau (NBT) auf Polyacrylamidgel (PAG) und nach isoelektrischer Fokussierung (IEF) als indirekte Verfahren zur Bestimmung der Superoxiddismutase (SOD)-Aktivität (siehe Mat. und Methoden 2.3.4.1. und 2.3.4.3.).

SOD A : Cyanid (Cn^-)-sensitive Superoxiddismutase (enthält Kupfer und Zink).

SOD B : Cyanid (Cn^-)-insensitive Superoxiddismutase (enthält Mangan).

XOX : Xanthinoxidase

Im Rahmen dieser Arbeit wurden der Cytochrom c-Reduktionshemmtest, der Nitritformationshemmtest und die Hemmung der Photoreduktion von Nitrotetrazoliumblau als gebräuchliche indirekte Testverfahren der Superoxiddismutase - Aktivitätsbestimmung verwendet.

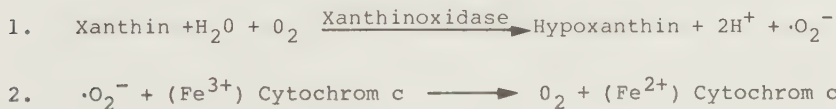
2.3.4.1. Hemmung der Reduktion von Cytochrom c in Lösung

2.3.4.1.1. Prinzip

Zur Generierung der Superoxidradikale als Reduktionsäquivalente dient in diesem Test die katalytische Umsetzung von Xanthin durch die Xanthinoxidase, in deren Verlauf $\cdot\text{O}_2^-$ -Radikale gebildet werden (32, 72).

Das dreiwertige Eisen, welches in der HÄM-Gruppe des Cytochrom c komplex gebunden ist, wird von $\cdot\text{O}_2^-$ zu zweiwertigem Eisen reduziert. Diese Reaktion ist durch eine Änderung des Absorptionsspektrums gekennzeichnet und läßt sich photometrisch bei 550 nm verfolgen, da (Fe^{2+}) Cytochrom c bei dieser Wellenlänge ein charakteristisches Absorptionsmaximum aufweist.

Es ergibt sich folgende Reaktionsgleichung:



Die Kinetik der Reduktion von Cytochrom c (Nullwert) und ihre Hemmung (Probe) wurde für die quantitative Bestimmung der Superoxiddismutase-Aktivität verfolgt.

2.3.4.1.2. Lösungen für den Testansatz:

- 1) 0,05 M KPO_4 -Puffer, pH 7,8 (sauerstoffgesättigt durch Einleitung von gasförmigem Sauerstoff über zwei Stunden, 4°C).
- 2) Di-Natrium-EDTA $3 \cdot 10^{-3}$ M (4°C)
112 mg EDTA
ad 100 ml H_2O bidest.
- 3) Xanthin $1,5 \cdot 10^{-3}$ M (4°C ; frisch hergestellt)
11,4 mg Xanthin in 2,5 ml 0,1 N NaOH lösen
ad 50 ml H_2O bidest.
- 4) Cytochrom c $3 \cdot 10^{-4}$ M
37,2 mg Cytochrom c (Fe^{3+}) (4°C , frisch hergestellt)
ad 10 ml H_2O bidest.

Zur Kontrolle dient die Extinktionsmessung der 1:10 verdünnten Stammlösung:

$\text{OD}_{550\text{nm}} = 0,300 (\pm 0,02)/\text{gegen Luft}.$

2.3.4.1.3. Testansatz:

	Leerwert	Nullwert	Probe/Standard
Puffer (μ l)	2500	2500	2500
aqua bid. (μ l)	200	100	---
EDTA (μ l)	100	100	100
Xanthin (μ l)	100	100	100
Cytochrom c (μ l)	100	100	100
Probe/Standard- Verdünnung (μ l)	---	---	100
gut mischen, 30 sec stehenlassen			
Xanthinoxidase (μ l) (80 mU/ml)	---	100	100
Gesamtvolumen (μ l)			
	3000	3000	3000

Beckman Spektralphotometer Modell 35

OD_{550 nm} /Luft

3 Messungen: Meßdauer ca. 10 sec; Meßintervall 60 sec

Spreizung 0 - 0,2 A; Schreibervorschub

2 inch/min (50,8 mm/min)

Für jede Probe wurde eine Doppelbestimmung angesetzt.

Die einzelnen Testlösungen müssen auf Eis gekühlt sein und zügig pipettiert werden (ca. 5 Doppelbestimmungen pro Ansatz), um bei der Temperaturempfindlichkeit des kinetischen Testverfahrens eine Reproduzierbarkeit zu gewährleisten (bei einer Erhöhung der Meßtemperatur von 20 °C auf 37 °C verdoppelt sich die Geschwindigkeit der Reduktionskinetik).

Sofort nach kurzem Rühren im Anschluß an die Zugabe des Startreagenzes Xanthinoxidase wird die Messung der Kinetik begonnen und über ca. 3 Minuten graphisch mittels Direktschreiber erfaßt.

2.3.4.1.4. Quantitative Auswertung

Die Meßdaten wurden für die quantitative Bestimmung der Superoxiddismutase nach folgenden Gesichtspunkten ausgewertet:

Der Leerwert diente als Kontrollparameter für die Konstanz der Ausgangsbedingungen und betrug bei OD_{550nm} 0,132 ($\pm 0,07$).

Der Nullwert ist definiert als die ungehemmt ablaufende Reduktions-Kinetik, welche als Extinktionsänderung pro Zeiteinheit ($\Delta E_{550nm}/min$) gemessen wird.

Definitionsgemäß entspricht 1 Unit Superoxiddismutase-Aktivität einer 50%igen Hemmung der Nullwertkinetik.

Zur Ermittlung der Eichgerade - sie wurde an jedem Versuchstag neu aufgestellt - wurden folgende Standard-Verdünnungen eines Referenzzyms (Rindererythrocyten Cu/Zn Superoxiddismutase, Diagnostic Data USA), ausgehend von einer Stammlösung der Konzentration 1 mg/ml, hergestellt und gemessen:

1:200 - 1:400 - 1:600 - 1:1200

Eine Linearität der Standard-Eichkurven läßt sich durch Auftragen der Werte auf Logit-Papier erzielen (55). Bei diesem Verfahren werden auf der Abszisse die Verdünnungen bzw. Units im dualen Logarithmus, auf der Ordinate die Änderung der OD_{550nm} pro Minute in konventionellem Maßstab aufgetragen. Für die Verdop-

pelung einer Verdünnung wurden auf der Abszisse 4 cm als Abstand festgelegt.

Die Verdünnung am Koordinaten-Schnittpunkt wurde willkürlich auf 1:100 festgesetzt.

Folgende Formel ermöglicht die Skalierung der Abszisse entsprechend dem dualen Logarithmus:

$$c = \frac{4}{\ln 2} \cdot (\ln x - \ln 100)$$

c: cm auf der Abszisse

x: Verdünnung an der gesuchten Stelle

Zur Ermittlung der Verdünnung (1:n), bei welcher die Standard-Cu/Zn Superoxiddismutase eine Aktivität von 1 Unit aufweist, ist die folgende Umwandlung obiger Gleichung erforderlich:

$$x = \text{anti ln} \left(\frac{c \cdot \ln 2}{4} + \ln 100 \right)$$

c ergibt sich aufgrund der Definition als Funktion des halben

$\Delta E_{550\text{nm}}/\text{min}$ - Wertes vom Nullwert.

In gleicher Weise wird die Verdünnung der Standard-Superoxiddismutase ermittelt, welche der Aktivität einer Probe entspricht (Verdünnung 1:m).

Die Aktivität (A) der Probe in Units/ml berechnet sich aus:

$$A = \frac{n}{m} \cdot 10 \cdot \text{Verdünnung der Probe;}$$

Der Faktor 10 berücksichtigt das im Test eingesetzte Probenvolumen von 100 μl .

Ferner wurde für jede Probe eine Verdünnung gewählt, welche in ihrer Aktivität im Bereich von 0,6 bis 1,4 U/100 μl lag, da die Zuverlässigkeit der Bestimmung um 1 U/100 μl am größten ist.

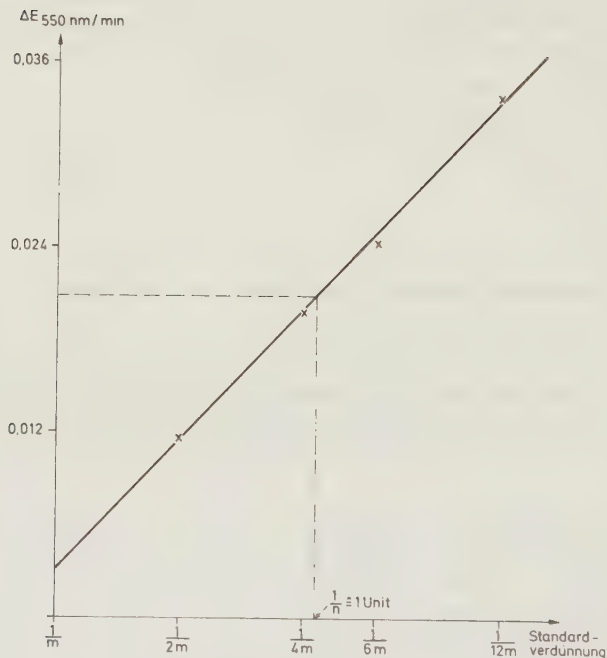


Abb. 9 : Cytochrom c-Reduktionshemmtest: Eichgerade zur Ermittlung der Superoxiddismutase-Aktivität über die Hemmung der Reduktion von Cytochrom c.

Zur Erstellung der Eichgerade dienten vier Verdünnungen einer Cu/Zn Superoxiddismutase-Standardlösung aus Rindererythrocyten (1 mg/ml); die Auftragung erfolgte auf Logit-Papier (siehe Text).

Abszisse: Verdünnungen der Superoxiddismutase-Standardlösungen ($\frac{1}{m}$; $\frac{1}{2m}$;); $\frac{1}{n}$ = Standardverdünnung, welche der Aktivität 1 Unit entspricht.

Ordinate: gemessene Cytochrom c Reduktion ($\Delta E_{550 \text{ nm/min}}$).

1 Unit ist definiert als die Superoxiddismutase-Aktivität, welche die gemessene Cytochrom c Reduktion ($\Delta E_{550 \text{ nm/min}}$) ohne Superoxiddismutase (Nullwert) zu 50 % hemmt.

Korrelation: 0,999

Für jeden Meßtag wurde eine neue Eichgerade erstellt.

2.3.4.1.5. Abhängigkeit der Aktivität der Cu/Zn Superoxiddismutase von verschiedenen Cyanid-Konzentrationen

Die Aktivität der Cu/Zn Superoxiddismutase ist durch Cyanid hemmbar (113), wobei der Angriffspunkt des Cyanids am aktiven Zentrum des Metallproteins bekannt ist (28). Die Zugabe von Natriumcyanid zum oben beschriebenen Testansatz erfolgt in verschiedenen Konzentrationen und wird anstelle von 100 μ l Puffer eingesetzt.

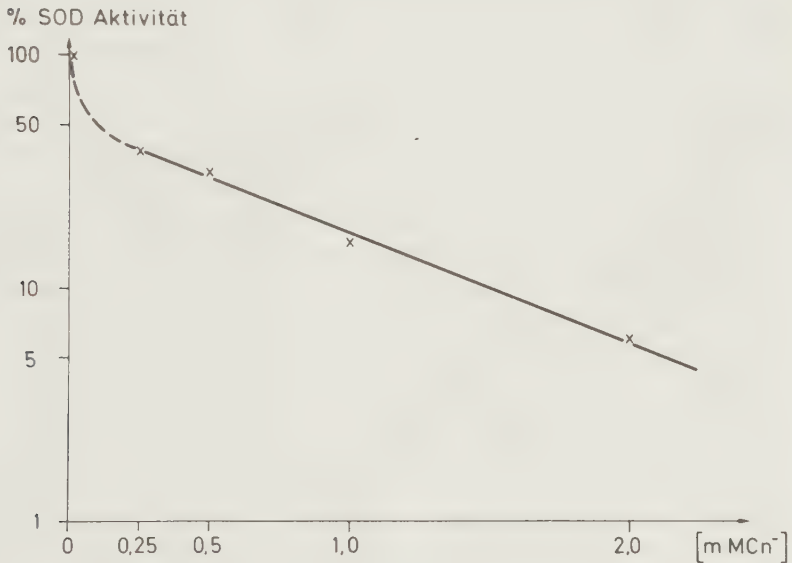


Abb. 10: Cytochrom c-Reduktionshemmtest: Darstellung der Abhängigkeit der Cu/Zn Superoxiddismutase-Aktivität von verschiedenen Cyanid-Konzentrationen (0 - 2 mM) im Testansatz. Abszisse: Cyanid-Konzentration im Testansatz (mM). Ordinate (logarithmischer Maßstab): Aktivität einer bovinen Cu/Zn Superoxiddismutase (100 %), welche im Testansatz ohne Cyanid eine Aktivität von 1 Unit aufweist. Korrelation der Meßwerte (Cyanid-Konzentration 0,25 - 2 mM): - 0,998

Steigende Cyanidkonzentrationen bis zu 3 mM Cyanid im Testvolumen zeigen eine lineare Abhängigkeit der Cytochrom c - Reduktionshemmung von der Cyanidkonzentration. Die Parallelität der Hemm-Geraden deutet darauf hin, daß die Kinetik der Reduktionshemmung im Bereich der angegebenen Konzentrationen (0,5 - 3,0 mM Cyanid) nur von der Hemmung des Enzyms abhängt. Bei einer Konzentration von 4 mM Cyanid bricht das Testsystem zusammen. Bereits im Nullwert-Ansatz findet keine Reduktion von (Fe^{3+}) Cytochrom c mehr statt. Dies ist möglicherweise auf eine Hemmung der Xanthinoxidase durch Cyanid zurückzuführen (26). Aufgrund dieser Versuchsergebnisse wurde für die Hemmung der Cu/Zn Superoxiddismutase eine maximale Konzentration von 3 mM Cyanid gewählt.

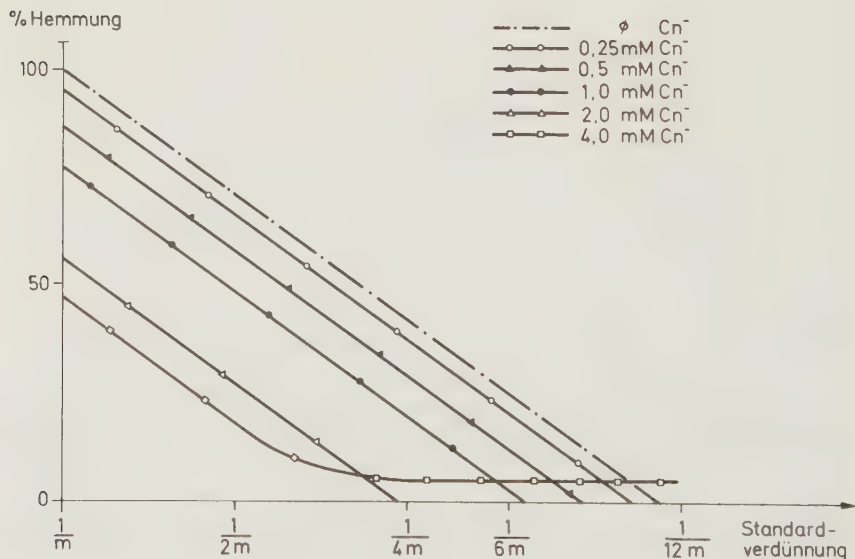


Abb. 11: Cytochrom c-Reduktionshemmttest: Aktivität der Cu/Zn Superoxiddismutase in Abhängigkeit von (mM) NaCN (Natriumcyanid-Konzentrationen im Testansatz: 0,25 mM, 0,5 mM, 1,0 mM, 2,0 mM, 4,0 mM NaCN).

Abszisse: Verdünnung der Superoxiddismutase-Standardlösung

$(\frac{1}{m}; \frac{1}{2m}; \dots;)$

Ordinate: % Hemmung der Reduktion von Cytochrom c, bezogen auf 0 % Hemmung (Nullwert: Testansatz ohne Superoxiddismutase).

Die % Hemmung der Reduktion von Cytochrom c in Abhängigkeit von Cyanid (mM) wurde in vier verschiedenen Verdünnungen einer bovinen Cu/Zn Superoxiddismutase-Standardlösung (1 mg/ml) untersucht. Die Auftragung erfolgte auf Logit-Papier (siehe Text).

2.3.4.2. Hemmung der Nitritbildung aus Hydroxylammoniumchlorid in Lösung (27, 54)

2.3.4.2.1. Prinzip

Dieses indirekte Verfahren bedient sich, ebenso wie der Cytochrom c - Reduktionshemmtest, eines Systems aus Xanthin/Xanthinoxidase als Quelle zur Bildung der Superoxidradikale. Diese $\cdot O_2^-$ -Radikale oxidieren Hydroxylammoniumchlorid zur entsprechenden Nitritverbindung. Das Enzym Superoxiddismutase konkurriert mit diesem zweiten Reaktionsschritt durch katalytisches Umsetzen der $\cdot O_2^-$ -Radikale. Die nach einer Inkubationszeit gebildete Menge an Nitrit im reinen Testsystem (Nullwert) im Vergleich zur Nitritbildung bei Zugabe von Enzym (Probe) ist unter definierten Reaktionsbedingungen proportional der Aktivität der Superoxiddismutase. Im Gegensatz zum Cytochrom c-Reduktionshemmtest wird die Hemmung der Nitritbildung nicht kinetisch verfolgt sondern die Menge der gebildeten Nitritverbindung nach einer definierten Reaktionszeit im Sinne einer Endpunktmethode photometrisch bestimmt. Dazu wird in einer Hilfsreaktion die Nitritgruppe in Form einer Azokupplung an Sulfanilsäure gebunden und die Diazoverbindung nach Zugabe von alpha-Naphthylamin durch Blaufärbung nachgewiesen.

Die Intensität der Farbbildung wird bei 530 nm gemessen. Die Hemmung dieser Farbbildung stellt indirekt ein Maß für die Superoxiddismutase-Aktivität dar.

2.3.4.2.2. Lösungen für den Testansatz

1) 0,065 M KPO_4 - Puffer pH 7,8 (4 °C, sauerstoffgesättigt)

2)	Xanthin	11,42 mg	
	0,1 N NaOH	2,5 ml	kalt
	H_2O bidest.	7,5 ml	kalt

10 ml Lösung
(frisch hergestellt)

3)	Hydroxylammoniumchlorid	6,95 mg
	H_2O bidest.	10 ml

10 ml Lösung
(frisch hergestellt)

4)	Xanthinoxidase (0,4 U/mg)	0,1 ml
	H_2O bidest.	4,9 ml kalt

5 ml Lösung
(frisch hergestellt)

5)	alpha-Naphthylamin	0,5 g
	H_2O dest.	100 ml kochend

(abkühlen lassen)

	Eisessig	125 ml
	H_2O dest.	275 ml

500 ml Lösung
(lichtgeschützt aufbewahrt)

6)	Sulfanilsäure	1,65 g
	H_2O dest.	375 ml warm
	Eisessig	125 ml

500 ml Lösung

2.3.4.2.3. Testansatz

	Probenwert	Nullwert
Puffer (μl)	1000	1000
Xanthin (μl)	100	100
Hydroxylammoniumchlorid (μl)	100	100
H ₂ O bidest. (μl) sauerstoffgesätt.	500	600
Probe (μl)	100	—
kurz schütteln		
Xanthinoxidase (μl)	200	200
(80mU/ml)		
	2000 μl	2000 μl
gut schütteln, genau 30 min im Wasserbad bei 25°C inkubieren		
H ₂ O bidest. (μl)	1500	1500
Probe/Nullwert (μl)	500	500
Sulfanilsäure (μl)	500	500
kurz schütteln, 30 Sekunden warten		
alpha-Naphthylamin (μl)	500	500
gut schütteln, 20 Minuten stehen lassen		

Die angegebenen Inkubationszeiten und Temperaturwerte wurden konstant gehalten. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt.

2.3.4.2.4. Quantitative Auswertung

Der Nullwert ergibt sich aus der ungehemmt ablaufenden Nitritbildungsreaktion, deren Quantität nach chemischem Umsatz zum blauen Farbstoff photometrisch durch die Extinktionsmessung bei 530 nm gegen Luft erfaßt wird.

Definitionsgemäß entspricht 1 U Superoxiddismutase-Aktivität einer 50%igen Hemmung der Farbbildung des Nullwertes.

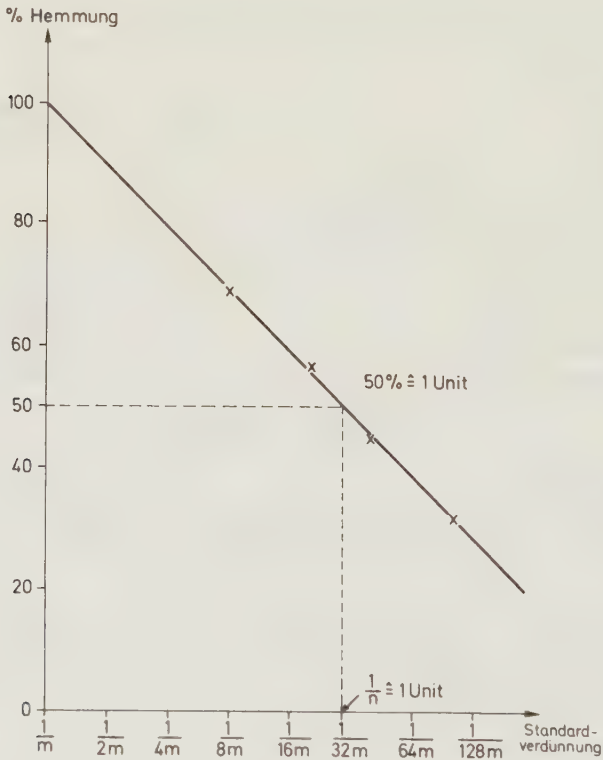


Abb. 12: Nitritformationshemmtest: Eichgerade zur Berechnung der Superoxiddismutase-Aktivität durch Hemmung der Nitritbildung.

Zur Erstellung der Eichgerade dienten 4 Verdünnungen einer Cu/Zn Superoxiddismutase-Standardlösung (1 mg/ml); Auftragung auf Logit-Papier (s. Text).

Abszisse: Verdünnungen der Superoxiddismutase-Standardlösung ($\frac{1}{m}$; $\frac{1}{2m}$; ...;). $\frac{1}{n}$ = Standardverdünnung, welche der Aktivität 1 Unit entspricht.

Ordinate: % Hemmung der Farbkomplexbildung (Nitritformation) in bezug auf 0 % Hemmung (Nullwert: Testansatz ohne Superoxiddismutase).

Korrelation: -0,999

Für jeden Test wurde eine Eichgerade erstellt.

2.3.4.2.5. Abhängigkeit der Aktivität der Cu/Zn Superoxiddismutase von verschiedenen Cyanidkonzentrationen

Es zeigt sich, daß - ähnlich wie beim Cytochrom c - Reduktionshemmtest - durch Zugabe von Cyanid bis zu einer Konzentration von 3 mM die Linearität der Superoxiddismutase-Aktivität in einer Verdünnungsreihe nicht beeinträchtigt wird.

Andererseits läßt bereits eine Konzentration von 0,25 mM Cyanid im Testansatz die Extinktion des Nullwertes, der der ungehemmten Nitritbildung entspricht, um ca. 30% ansteigen. Dies erklärt sich möglicherweise durch eine konzentrationsunabhängige Beeinflussung der Xanthinoxidase durch Cyanid, welches an dieser einen Übergang vom Ein- zum Zwei- Elektronenschritt bewirkt (26).

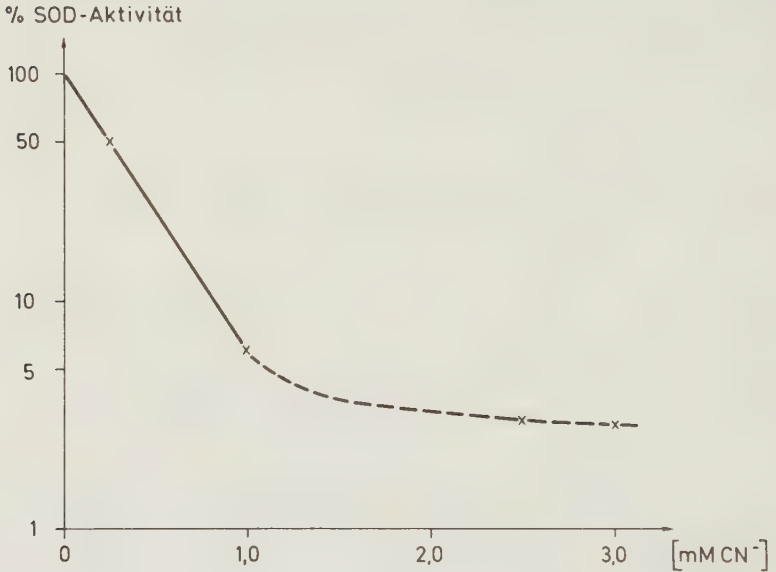


Abb. 13: Nitritformationshemmtest: Darstellung der Abhängigkeit der Cu/Zn Superoxiddismutase-Aktivität von der Cyanid-Konzentration im Testansatz.

Abszisse: Konzentration des Cyanid im Testansatz (mM)

Ordinate (logarithmischer Maßstab): Cu/Zn Superoxiddismutase-Aktivität (%) bezogen auf die Aktivität einer Cu/Zn Superoxiddismutase (100%), welche im Testansatz ohne Cyanid eine Aktivität von 1 Unit aufweist.

2.3.4.3. Hemmung der Photoreduktion von Nitrotetrazoliumblau

Durch photochemische Aktivierung von Riboflavin in Gegenwart von N, N, N', N' - Tetramethylethyldiamin (TEMED) und Sauerstoff werden $\cdot\text{O}_2^-$ -Radikale freigesetzt, welche das Nitrotetrazoliumblau zum entsprechenden blauen Formazanderivat reduzieren können. Die Superoxiddismutase konkurriert mit dieser Farbstoffbildung durch katalytisches Umsetzen der $\cdot\text{O}_2^-$ -Radikale. Dieses indirekte Nachweisverfahren für SOD-aktive Verbindungen läßt sich sowohl in Lösung (11) als auch nach vorheriger Auftrennung des zu untersuchenden Proteingemisches durch gelchromatographische Methoden auf Polyacrylamidgelen durchführen (11). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Hemmung der Photoreduktion von Nitrotetrazoliumblau sowohl nach vorheriger Trennung der Proteine durch isoelektrische Fokussierung als auch durch Polyacrylamid - Diskgelelektrophorese für die Aktivitätsbestimmung der Superoxiddismutase angewandt.

2.3.4.3.1. Hemmung der Photoreduktion von Nitrotetrazoliumblau nach vorheriger isoelektrischer Fokussierung (11)

Das Proteingemisch wird in einem pH-Gradientengel aufgetrennt, und die Einzelkomponenten werden an der Stelle fokussiert, die ihrem jeweiligen isoelektrischen Punkt (Nettoladung $\pm$ Null) entspricht.

Dieses Verfahren zeichnet sich durch große Trennschärfe aus und ermöglicht unter anderem die Darstellung von Isoenzymen. Anschließend wird die Superoxiddismutase-Aktivität nach dem oben beschriebenen Prinzip auf dem Gel lokalisiert.

2.3.4.3.1.1. Durchführung

Die vorbereiteten Proben werden auf PAG-Gelplatten (LKB Ampholine PAG-plates) nach der Methode von LKB (63) isoelektrisch fokussiert. Verwendet werden Gelplatten im pH-Bereich 3,5 bis 9,5 bzw. 4,0 bis 6,5. Der pH-Bereich 3,5 bis 9,5 wurde zur Untersuchung von Säuleneluaten und Reinigungsschritten im Rahmen der Enzymisolierung sowie der Charakterisierung von Zellhomogenaten (11500g-Überstände) eingesetzt. Der pH-Bereich 4,0 bis 6,5 diente aufgrund seiner höheren Auflösung im Bereich der isoelektrischen Punkte bereits bekannter Cu/Zn Superoxiddismutasen aus anderen Geweben zur Isoenzymanalyse der in dieser Arbeit durchgeführten Enzympräparationen.

2.3.4.3.1.2. Elektrophoresebedingungen für die isoelektrische Fokussierung

pH-Bereich	pH 3,5 - 9,5	pH 4,0 - 6,5
Elektrophoresedauer (min)	90	150
Kühltemperatur (°C)	10	10
maximale Spannung (V)	1500	2000
maximale Stromstärke (mA)	50	25
Leistung (W)	30	25
Anodenlösung	1 M H ₃ PO ₄	0,1 M Glutaminsäure in 0,5 M H ₃ PO ₄
Kathodenlösung	1 M NaOH	0,1 M Beta-Alanin
aufgetr. Probenvolumen (max)	20 µl	20 µl
aufgetr. Proteinmenge je Probe	10 µg	10 µg

Unmittelbar nach Abschluß der isoelektrischen Fokussierung wird die Hemmung der Photoreduktion von Nitrotetrazoliumblau zur Identifizierung der Superoxiddismutase auf den Gelen durchgeführt.

2.3.4.3.1.3. Lösungen

- Lösung (1) 1,0 g NBT in 500 ml 0,036 M KPO_4 - Puffer, pH 7,8, gelöst.
- Lösung (2) 10 mg Riboflavin + 3 ml TEMED in 1000 ml 0,036 M KPO_4 - Puffer, pH 7,8, gelöst.
- Lösung (3) Konservierungslösung: 100 ml reines Äthanol + 32 ml Eisessig, ad 400 ml H_2O , + 40 ml Glycerin.

Die Gele werden zunächst lichtgeschützt in Färbeschalen mit Lösung (1) 20 min lang inkubiert. Es folgt - ebenfalls im Dunkeln - eine 15minütige Inkubation mit Lösung(2). Daraufhin werden die Gele auf einer mit Alufolie bespannten Platte für 20 min einer Bestrahlung mit UV-Licht ausgesetzt, welche in einer Belichtungskammer mit zwei 16 W UV-Lampen erfolgt.

Die gefärbten Gele werden 1 Std. lang in Lösung (3) konserviert und staubfrei getrocknet.

Die achromatischen Banden auf den blaugefärbten Gelen entsprechen den Isoenzymen der Superoxiddismutase. In Referenzgelen wird der pH-Wert mit Hilfe einer speziellen Flachbettelektrode in 1 cm-Abständen auf dem Gel bestimmt.

2.3.4.3.2. Hemmung der Photoreduktion von Nitrotetrazoliumblau nach vorheriger Diskgelelektrophorese (22, 84)

Proteinproben werden auf die obere Gelschicht (Sammelgel) der Diskgele aufgetragen und in dieser zunächst konzentriert. Die Einzelkomponenten treten anschließend als scharfe Banden in die untere Gelschicht (Trenngel) ein. In dieser werden sie nach elektrophoretischer Beweglichkeit und Größe im elektrischen Feld aufgetrennt..

2.3.4.3.2.1. Lösungen zur Herstellung der Gele (43, 67)

Trenngel

Lösung 1	48,0 ml 1 N HCl
	36,3 g Tris pH 8,9
	0,23 ml Temed
	ad 100 ml H ₂ O dest.

Lösung 2	28,0 g Acrylamid
	0,735 g bis -Acrylamid
	ad 100 ml H ₂ O dest.

Lösung 3	0,14 g Persulfat
	ad 100 ml H ₂ O dest.

Sammelgel

Lösung 4	48,0 ml 1 N HCl
	5,98 g Tris pH 6,7
	0,46 ml Temed
	ad 100 ml H ₂ O dest.

Lösung 5	10,0 g Acrylamid
	2,5 g bis - Acrylamid
	ad 100 ml H ₂ O dest.

Lösung 6	4,0 mg Riboflavin
	ad 100 ml H ₂ O dest.

Lösung 7	40,0 g Saccharose
	ad 100 ml H ₂ O dest.

Mischungsverhältnis der Lösungen zur Gelherstellung:

Sammelgel

1 Teil Lösung 4
2 Teile Lösung 5
1 Teil Lösung 6
4 Teile Lösung 7

Trenngel (7,5% Acrylamid pH 8,9)

1 Teil Lösung 1
2 Teile Lösung 2
1 Teil H₂O dest.
4 Teile Lösung 3

Elektrodenpuffer:

6,0 g Tris
28,8 g Glycin pH 8,3
ad 1000 ml H₂O dest.

zum Gebrauch 1:10 verdünnen.

2.3.4.3.2.2. Gelherstellung

Für jeden Elektrophoreselauf werden 14 Polyacrylamidgele gemäß der Methode von Davis (22) in speziellen Glasröhrchen (Innendurchmesser 4 mm, Länge 10 cm) hergestellt. Nach dem vorsichtigen Absaugen des Wassers von den polymerisierten Gelen werden die Röhrchen in die Elektrophoresekammer eingesetzt. Durch schnelles Drehen beim Aufsetzen des Kammeroberteiles läßt sich verhindern, daß der Kontakt der Gele zum Elektrodenpuffer durch Luftblasen gestört wird.

2.3.4.3.2.3. Probenvorbereitung

Von einer mit wässriger Glycerinlösung (50%) verdünnten Probenlösung (11500g-Überstände der Zell- oder Gewebshomogenate, gereinigte Endstufen der Enzymisolierungen), der eine Spur Bromphenolblau als Frontindikator zugesetzt wird, werden Volumina von 50 μ l bis 100 μ l aufgetragen. Das jeweilige Volumen entspricht einer Proteinmenge von 1 μ g bzw. 5 μ g.

2.3.4.3.2.4. Durchführung der Elektrophorese

Vor dem Auftragen der Proben wird eine Präelektrophorese von 1 Stunde Dauer durchgeführt. Bei einer Stromstärke von 1,5 mA pro Gel liegt die Spannung zwischen 120 V und 180 V. Die Proben werden - den Elektrodenpuffer unterschichtend - auf die Gele aufgetragen. Die Dichteerhöhung durch den Glycerinzusatz verhindert ein Aufwirbeln der Probenlösung beim Auftragen. Die Elektrophorese erfolgt mit einer Stromstärke von 2 mA pro Gel und einer Spannung von 220 - 250 V bei einer Kühltemperatur von 12°C und wird nach 2 Stunden beendet. Bis zu diesem Zeitpunkt ist die Bromphenolblaubande bis ca. 0,5 - 1 cm oberhalb des anodischen Gelendes gewandert.

Die Gele werden vorsichtig mit einer Mikroliter-Spritze aus den Röhrchen herausgelöst; anschließend wird die Hemmung der Photo-reduktion von Nitrotetrazoliumblau als Aktivitätstest der Superoxiddismutase auf den Gelen durchgeführt. Die Inkubation der Gele in den vorbereiteten Lösungen erfolgt nach dem unter 2.3.4.3.1.3. beschriebenen Verfahren.

Bis zur photographischen Dokumentation lassen sich die Gele nach der UV-Bestrahlung in 0,036 M KPO_4 - Puffer, pH 7,8 aufbewahren.

2.3.5. Enzymaktivitätsbestimmung der Superoxiddismutase - direkte Methode

Im Rahmen dieser Arbeit kam als direkte Methode zur Aktivitätsbestimmung der Superoxiddismutasen die Pulsradiolyse zur Anwendung. Mit diesem Verfahren kann die Dismutasereaktion der Superoxidradikale ($\cdot\text{O}_2^-$) direkt verfolgt werden, indem die Kinetik der Lichtabsorption von $\cdot\text{O}_2^-$ -Ionen direkt gemessen wird. Auf diese Weise lassen sich auch Reaktionskonstanten und Reaktionsordnungen ermitteln.

2.3.5.1. Pulsradiolyse (12, 29, 59)

Bei der Pulsradiolyse werden in sauerstoffgesättigter und formiathaltiger Lösung (0,01 - 0,1 M Formiat) durch Elektronenpulse von 100 ns Dauer mit einer Energie von 1,8 MeV und einer Dosis zwischen 0,15 und 5 krad/Puls praktisch nur $\cdot\text{O}_2^-$ -Ionen in einer Konzentration zwischen 1 μM und 35 μM produziert. Sauerstoffgesättigte, formiathaltige, wässrige Lösungen stellen eine hervorragende Quelle für Superoxidanionen dar. Die Lösungen für die Pulsradiolyse werden mit dreifach destilliertem und pyrrolisiertem Wasser ohne Pufferzusatz hergestellt.

Zur Einstellung des pH-Wertes wird 1N NaOH bzw. 1N HClO_4 verwendet. Bei der hier benutzten Febetron Pulsradiolyseanlage des Strahlenbiologischen Instituts der Universität München diente in der Detektoranlage eine Osram XBO 450 W Xenonlampe als Lichtquelle.

Über Spiegelsysteme, Monochromator und Photomultiplier wird der Lichtstrahl in den Meßraum geleitet und gemessen.

Die Bestimmung der Reaktionskonstanten und -ordnungen erfolgt durch computergestützte Auswertung der Abklingkinetiken.

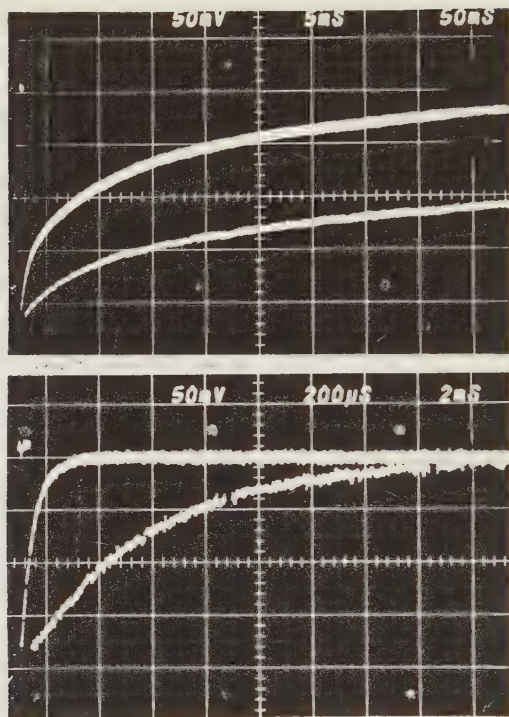


Abb. 14: Abklingkurven des Zerfalls pulsradiolytisch erzeugten Superoxids (59). Die bei 250 nm gemessenen zeitabhängigen Absorptionsänderungen wurden auf dem Schirm eines Oszilloskops dargestellt und mit einer Polaroidkamera aufgenommen. Am oberen Rand der Bilder sind die eingestellten Bereiche des Oszilloskops für Empfindlichkeit und Zeitablenkung pro Rastereinheit (cm) eingeblendet.

Oberes Bild: Spontandismutation, 400 msec nach Reaktionsbeginn sind immer noch Superoxidradikale zu beobachten. Unteres Bild: Die durch Cu/Zn Superoxiddismutase ($9,1 \times 10^{-6}$ M) katalysierte Dismutationsreaktion ist bereits nach 2 msec beendet.

2.3.6. Spezielle analytische Methoden

Für die proteinchemische Analyse der Reinigungsschritte und Endprodukte der Superoxiddismutase-Isolierungsarbeiten wurden die bereits beschriebenen Methoden der isoelektrischen Fokussierung und der Diskgelelektrophorese auf Polyacrylamidgelen angewandt.

2.3.6.1. Auftrennung der Proteine durch isoelektrische Fokussierung (63)

Prinzip und Durchführung der isoelektrischen Fokussierung sind bereits unter 2.3.4.3.1. beschrieben. Nach Beendigung der Fokussierung wird eine Hälfte des Gels für den qualitativen Nachweis der Superoxiddismutase-Aktivität (s. 2.3.4.3.1.2./3.) eingesetzt, die andere Gel-Hälfte mit identischen Proben zur Darstellung der Proteine weiterverarbeitet. Die nach dem jeweiligen Trennprinzip aufgetrennten Einzelproteine werden mit einer standardisierten Färbemethode auf dem Gel als Proteinbanden sichtbar gemacht. Parallel dazu wird auf demselben Gel die Hemmung der Photoreduktion von Nitrotetrazoliumblau als indirekter Nachweis der Superoxiddismutase-Aktivität durchgeführt. Damit wird eine Zuordnung der Superoxiddismutase-aktiven Proteinbanden möglich. Ebenso kann eine Identifizierung nicht aktiver Proteinanteile der gereinigten Enzympräparationen erfolgen.

Für die Proteinfärbung werden folgende Lösungen verwendet:

- 1) Fixierlösung: 57,5 g Trichloressigsäure
 17,25 g Sulfosalicylsäure
 in 500,0 ml H₂O dest.
- 2) Entfärbelösung: 500,0 ml Äthanol
 160,0 ml Eisessig
 ad 2000,0 ml mit H₂O dest.
- 3) Färbelösung: 0,46 g Coomassie Brill. Blue R250
 in 400,0 ml Entfärbelösung
- 4) Konservierungs- 40,0 ml Glycerin
 lösung: zu 400,0 ml Entfärbelösung

Das Gel wird 30 min lang in Fixierlösung aufbewahrt und anschließend für 5 min in Entfärbelösung gelegt.

Auf eine 10 minütige Inkubation in erhitzter Färbelösung (60°C Wasserbad) folgt eine ca. 24 Stunden dauernde Entfärbung des Gels durch mehrmaliges Wechseln der Entfärbelösung.

Nach Einwirken der Konservierungslösung (1 Stunde) wird das Gel staubfrei getrocknet und durch eine Folie geschützt bis zur Auswertung aufbewahrt.

2.3.6.2. Auftrennung der Proteine durch Diskgelelektrophorese auf Polyacrylamidgelen (22, 84)

Diese bereits für den Nachweis der Superoxiddismutase-Aktivität beschriebene Technik (s. 2.3.4.3.2.) wurde in parallel angesetzten Gelröhrchen für die Proteinfärbung als empfindliches Verfahren der Reinheitsanalyse isolierter Superoxiddismutasen durchgeführt.

Es werden 5 μ g Protein pro Probe auf ein Gel aufgetragen. Nach Abschluß der Elektrophorese werden die aufgetrennten Proteine mit filtriertem 0,5 % (w/v) Amidoschwarz in 7% (v/v) Essigsäure für 10 min angefärbt. Die Entfärbung erfolgt mit 7% Essigsäure unter mehrmaligem Wechseln der Entfärbelösung.

2.3.6.3. Auftrennung der Proteine durch zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Ein hochauflösendes Verfahren zur Darstellung des Proteinmusters der aus den Enzymisolierungen gewonnenen Endprodukte kam mit der zweidimensionalen Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Anwendung (83).

2.3.6.3.1. Auftrennung durch isoelektrische Fokussierung auf Polyacrylamid-Ampholine-Gelen (1.Dimension)

Die analytische Qualität dieser Technik beruht auf der Auftrennung der Proteine nach zwei voneinander unabhängigen Parametern. Zunächst werden die Proteine in ihrem nativen Zustand gemäß ihrem jeweiligen isoelektrischen Punkt durch eine isoelektrische Fokussierung auf Polyacrylamid-Ampholine-Gelen getrennt (1.Dimension).

2.3.6.3.1.1. Lösungen zur Herstellung der Gele

Lösung 1: 12,0 g Acrylamid
 0,32 g Methylenbisacrylamid

ad 50,0 ml H₂O bidest.

Lösung 2: 30,0 mg Ammoniumperoxodisulfat
 in 100,0 ml H₂O bidest.

Lösung 3: 40% (v/v) Ampholine pH 4,0 - 6,5

Lösung 4: 0,5 ml Ampholine pH 4,0 - 6,5
 1,0 g Saccharose
 in 19,0 ml H₂O bidest.

Lösung 5: 0,2 ml TEMED
 19,8 ml H₂O bidest.

Elektrodenpuffer:

Anodenlösung: 0,1 % (w/v) Phosphorsäure pH 2,3

Kathodenlösung: 0,1 % (v/v) Äthanolamin pH 11,0

Probenpuffer (50 ml) zur Aufbewahrung der Gele nach
der isoelektrischen Fokussierung (1. Dimension):

Tris-HCl-Puffer 1 M pH 6,8	5 ml
SDS 10% (w/v)	25 ml
Glycerol	5 ml
H ₂ O bidest.	13 ml
Bromphenolblau	2 ml

2.3.6.3.1.2. Gelansatz (9 Röhrchen, Höhe 12 cm;
Durchmesser 0,2 cm)

3,0 ml Lösung (1)

8,0 ml Lösung (2)

0,6 ml Lösung (3)

Mischen und 2 min Entgasen

+ 0,8 ml Lösung (5)	-----
12,4 ml Mischung	

Jedes Glasröhrchen wird mit dieser Mischung gefüllt (Höhe 10 cm). Durch Überschichten mit H_2O bidest. entsteht eine glatte Geloberfläche. Die Polymerisation der Gele benötigt circa 30 Minuten. Nach dem Absaugen des überschichteten Wassers werden die Röhrchen an der Unterseite mit einer in Kathodenlösung gespülten Dialysiermembran verschlossen und luftblasenfrei in die mit der Kathodenlösung gefüllte Elektrophoresekammer eingesetzt.

2.3.6.3.1.3. Auftragen der Proben und Durchführung der isoelektrischen Fokussierung

Auf jedes Gel werden 10 μg des nativen gereinigten Proteins im Elutionspuffer des letzten Reinigungsschrittes (Vol. 7 μl bis 37 μl) aufgetragen. Danach werden je 35 μl Lösung (4) vorsichtig überschichtet. Anschließend wird die obere Kammerhälfte mit der Anodenlösung gefüllt.

Die Fokussierung erfolgt über 15 Std 30 min bei einer Spannung von 200 V und einer Stromstärke von 5 mA. Nach Beendigung werden die Gele durch vorsichtiges Umspritzen mit Glycerin aus den Röhrchen gelöst.

Zur Messung des pH-Gradienten wird ein Kontrollgel in 5 mm lange Stücke geschnitten, die in je 2 ml entgastem H₂O dest. gelöst werden; der pH-Wert der Einzelproben wird mit einem pH-Meter bestimmt. Die Probengele werden in mit je 5 ml Probenpuffer gefüllten Reagenzröhrchen bei -10°C eingefroren und bis zur Auftragung auf das Gradientengel (2.Dimension) aufbewahrt.

2.3.6.3.2. Auftrennung der isoelektrisch fokussierten Proteine auf Polyacrylamid-Gradientengel (2.Dimension)

Mittels einer Flachbett-Gradienten-Gelelektrophorese erfolgt in Anwesenheit von Natriumdodecylsulfat (SDS) eine Auftrennung der Proteine nach dem jeweiligen Molekulargewicht (2.Dimension). Es wird mit Flachgelen gearbeitet, welche einen hyperbolen Polyacrylamid-Gradienten (5% - 22,5%) aufweisen.

2.3.6.3.2.1. Lösungen für die Gradientengele

	5 %	22,5 %
Tris/HCl - Puffer 1 M pH 8,8	37,5 ml	37,5 ml
H ₂ O bidest.	41,8 ml	18,8 ml
SDS 10 % (w/v)	1,0 ml	1,0 ml
Acrylamid 30 % (w/v)	18,7 ml	-
Acrylamid 60 % (w/v)	-	42,0 ml

Für jeden Ansatz werden pro Gel 20 ml entnommen.

Vor dem Füllen der Gradientenmischkammern werden jeweils

Ammoniumperoxodisulfat 1,5% (w/v) 200 µl

TEMED 10 µl

als Startsubstanzen zur Polymerisation zugegeben.

2.3.6.3.2.2. Lösungen für das Spacergel

Acrylamid 30% - Bisacrylamid 0,8%	1000 µl
SDS 20%	50 µl
Tris/HCl - Puffer 1 M pH 6,8	1250 µl
H ₂ O bidest.	7600 µl

kurz vor dem Gießen des Gels werden
zugegeben:

Ammoniumperoxodisulfat 10%	100 µl
TEMED	10 µl

2.3.6.3.2.3. Agaroselösung

Zur Herstellung einer Verbindung zwischen dem Diskgel und dem
Flachgel dient folgende Agaroselösung:

Agarose	0,5 g
H ₂ O bidest.	25,0 ml
Tris/HCl - Puffer 1 M pH 6,8	5,0 ml
Glycerol	5,0 ml

kurz aufkochen

SDS 20 %	12,5 ml
beta-Mercaptoaethanol	2,5 ml

2.3.6.3.2.4. Herstellung des Polyacrylamid-Gradientengels

Zwischen zwei lotrecht eingespannte Gelplatten werden 2 ml 0,1% SDS von unten eingepumpt. Aus einer eisgekühlten Gradienten-Mischkammer wird das Gradientengel - ebenfalls von unten - rasch und kontinuierlich nachgepumpt. Da das Volumen der Mischkammer, welche anfangs die 5%ige Acrylamidlösung enthält, während des Ansaugens der 22,5%igen Acrylamidlösung aus der zweiten Kammer konstant gehalten wird, nimmt der Acrylamidgehalt in dem gegossenen Gel von oben nach unten nach Art eines hyperbolen Gradienten zu.

Die Polymerisation des Gradientengels benötigt etwa 1 - 2 Stunden. Ist diese erfolgt, wird der SDS-Überstand abgegossen und durch 3%iges Spacergel ersetzt. Auf das polymerisierte Spacergel wird ein auf Raumtemperatur gebrachtes Ampholine-Gel der vorherigen isoelektrischen Fokussierung (1.Dimension) aufgelegt. Durch Einspritzen von ca. 1 ml kochender Agaroselösung zwischen das Ampholine-Gel und das Spacergel wird ein guter Kontakt - Voraussetzung für eine ungehinderte Diffusion der Proteine in das Spacergel - hergestellt.

An einer Seite des Polyacrylamid Gradientengels werden in eine vorgeformte Tasche 5 µl einer Lösung mit Eichproteinen aufgetragen und mit 50 µl Agaroselösung überschichtet.

2.3.6.3.2.5. Zusammensetzung der Eichproteine:

	Molekulargewicht (Dalton)
Myosin	200 000
beta-Galactosidase	116 500
Phosphorylasé B	92 500
Serum - Rinderalbumin	66 200
Katalase	60 000
Ovalbumin (Hühnerei)	45 000
Aldolase	40 000
Chymotrypsinogen	25 000
Myoglobin	17 800
Cytochrom c	12 400

Elektrodenpufferlösungen:

Tray - Puffer (10-fach konzentrierte Stammlösung):

Tris 30 g
Glycin 144 g
ad 1000 ml H₂O bidest.
pH 8,3

Verwendeter Elektroden-Puffer:

Tray - Puffer (Stammlösung) 50 ml
SDS 20% 2,5 ml
ad 500 ml H₂O bidest.

2.3.6.3.2.6. Durchführung der Elektrophorese

Die Elektrophorese erfolgt bei einer konstanten Spannung von 250 V (Stromstärke 30 - 40 mA) während der ersten 45 Minuten bei 20°C (Raumtemperatur), anschließend für 4 Std bei 4°C (Kühlraum).

2.3.6.3.2.7. Färbung der Gradientengele

Lösungen für die Proteinfärbung:

1. Färbelösung:

Coomassie Brilliant Blau	1,25 g (= 0,25%)
Methanol	225 ml (= 45%)
Eisessig	50 ml (= 10%)
H ₂ O dest.	225 ml

2. Entfärbelösung:

a) starke	Methanol	250 ml (= 50%)
Entfärbe-	Eisessig	50 ml (= 10%)
lösung:	H ₂ O dest.	200 ml
b) schwache	Methanol	25 ml (= 5%)
Entfärbe-	Eisessig	50 ml (= 10%)
lösung:	H ₂ O dest.	425 ml

3. Konservierungslösung:

Eisessig	100 ml (= 10%)
Glycerin	30 ml (= 3%)
H ₂ O dest.	870 ml

Nach Abschluß der Elektrophorese werden die Gelplatten aus der Apparatur entfernt und über 12 Std. bei Raumtemperatur gefärbt. Anschließend wird ca. 10 Std. mit starker Entfärbelösung, dann ca. 1 Woche lang unter mehrmaligem Wechseln der Lösung mit schwacher Entfärbelösung behandelt.

In der Konservierungslösung werden die Gele bis zur Auswertung aufbewahrt.

2.3.6.3.3. Auswertung

Im Vordergrund des Interesses standen die Proteinmuster der einzelnen isolierten Enzyme. Zur Kontrolle des Molekulargewichts wurde durch semilogarithmische Auftragung des Molekulargewichts ($\log MW$) der Eichproteine gegen ihre jeweilige gemessene Wanderungsstrecke (mm) auf dem Gel für jedes Gel eine Eichgerade aufgestellt.

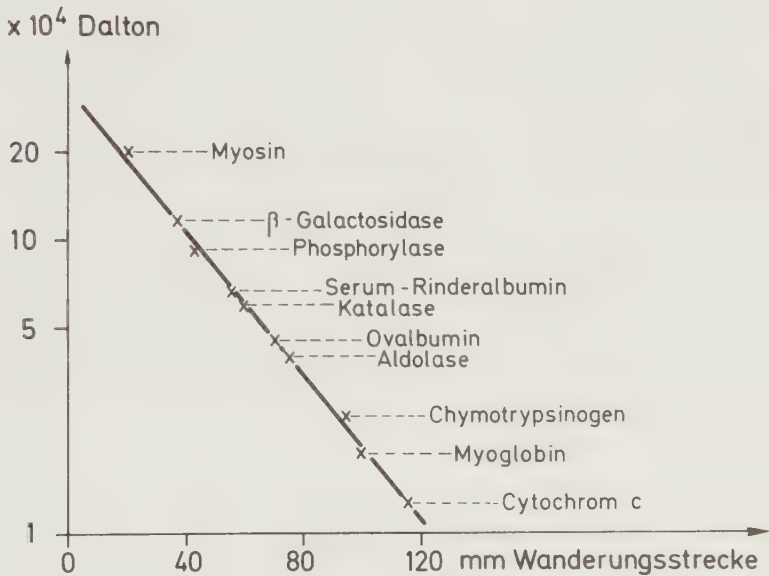


Abb. 15: Protein-Mapping: Eichgerade zur Berechnung des Molekulargewichts gereinigter Cu/Zn Superoxiddismutasen aus ihrer Wanderungsstrecke auf Polyacrylamid-Flachgelen (2.Dimension) nach vorheriger Auftrennung durch isoelektrische Fokussierung (1.Dimension). Zur Erstellung der Eichgeraden dienten 9 Eichproteine mit bekanntem Molekulargewicht (s. Text).

Abszisse: Wanderungsstrecke der Proteine (mm)
Ordinate: Logarithmus des Molekulargewichts (Dalton $\times 10^4$)
Korrelation: -0,998
Für jedes Gel wurde eine Eichgerade erstellt.

2.3.6.4. Metallgehalt

Zur Analyse der isolierten Proteine mit Superoxiddismutase-Aktivität hinsichtlich ihres Metallgehaltes an Kupfer und Zink diente die Atomabsorptionsspektrophotometrie.

2.3.6.4.1. Prinzip (17)

Die Probelösung wird durch einen Vernebler atomisiert. In einer Flamme (Acetylen/Luft - Brenngas) werden die Metallatome bei ca. 2500°C verdampft. Die Atome des zu messenden Metalls absorbieren bei einer für das Metall charakteristischen Wellenlänge Energie eines monochromatischen Lichtstrahls, der durch eine entsprechende Hohlkathodenentladungslampe produziert wird. Der absorbierte Energiebetrag ist der im optischen Weg anwesenden Anzahl von Atomen proportional.

2.3.6.4.2. Durchführung der Messungen

Der Metallgehalt an Kupfer wurde durch Absorption bei der Wellenlänge 324,7 nm bestimmt. Um einen störenden Einfluß der salzhaltigen Puffer, in denen die Enzyme gelöst waren, auf die Messung auszuschließen, wurden drei Eichkurven im linearen Meßbereich von 10 $\mu\text{g Cu}/100\text{ ml}$ bis 200 $\mu\text{g Cu}/100\text{ ml}$ aufgestellt. Der Metallgehalt an Zink wurde durch Absorption bei der Wellenlänge 213,9 nm ermittelt. Für einen linearen Meßbereich von

1 μg Zink/100 ml bis 30 μg Zink/100 ml wurden ebenfalls drei Eichkurven aufgestellt.

Die Kupfer- bzw. Zinkstandardlösungen, welche zur Berechnung der jeweiligen Eichkurve dienten, wurden mit Pufferlösungen der gleichen Konzentration hergestellt, in denen auch die jeweiligen zur Metallgehaltsmessung bestimmten Enzyme gelöst waren. Diese wurden zur Messung mit aqua bidest. im Verhältnis 1:5 oder 1:10 verdünnt und so auf einen Metallgehalt eingestellt, der im Bereich der jeweiligen Eichkurve lag. Die Berechnung des Kupfer- und Zinkgehaltes (Mol Cu pro Mol Cu/Zn SOD bzw. Mol Zn pro Mol Cu/Zn SOD) erfolgte auf der Grundlage der durch den molaren Absorptionskoeffizienten (104) ermittelten Proteinmenge. Für die zur Berechnung des Metallgehaltes eingesetzten Molekulargewichte der Superoxiddismutase - Enzyme wurden die Ergebnisse der Molekulargewichtsbestimmung (siehe 2.3.6.5) und die entsprechenden Molekulargewichtsangaben der Literatur (39) berücksichtigt.

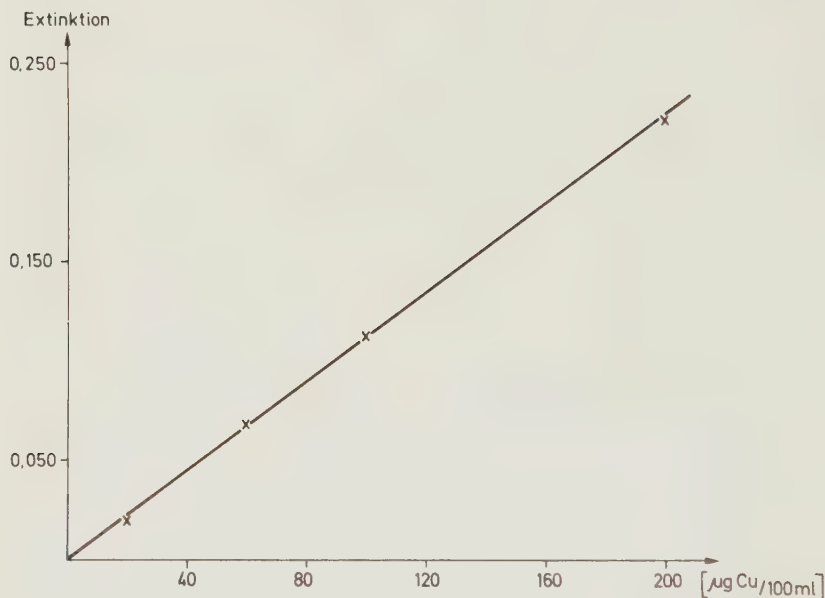


Abb. 16: Cu-Eichgerade für Metallgehaltbestimmung in gereinigten Cu/Zn Superoxiddismutasen.

Die Eichgerade wurde aus 4 Verdünnungen einer Kupfer-Standardlösung erstellt (siehe Text).

Abszisse: Konzentration des Kupfers ($\mu\text{g Cu}/100\text{ ml}$)

Ordinate: ΔE 324,7 nm gegen den Lösungspuffer der Proben (Leervwert) gemessen.

Korrelation: -0,998

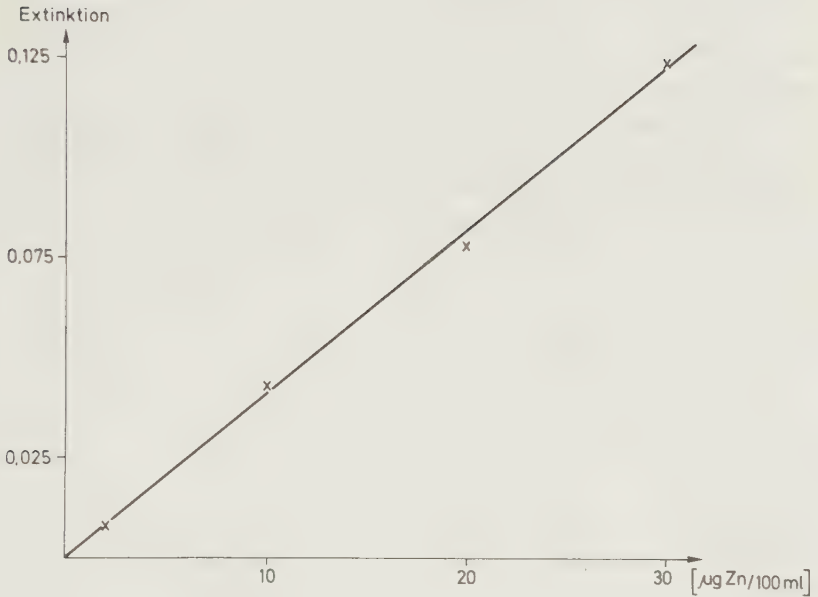


Abb. 17: Zn-Eichgerade für Metallgehaltbestimmung in gereinigten Cu/Zn Superoxiddismutasen.

Die Eichgerade wurde aus 4 Verdünnungen einer Zink-Standardlösung erstellt (siehe Text).

Abszisse: Konzentration des Zink ($\mu\text{g Zn}/100\text{ ml}$)

Ordinate: ΔE 213,9 nm gegen den Lösungspuffer der Proben (Leerwert) gemessen.

Korrelation: -0,998

2.3.6.5. Molekulargewicht

Die Molekulargewichtsbestimmung der Untereinheiten der isolierten Cu/Zn Superoxiddismutasen wurde durch Polyacrylamid - Diskgelelektrophorese in Anwesenheit des Detergens SDS durchgeführt (67, 105, 112). Die elektrophoretische Beweglichkeit der einzelnen Proteine im Gel ist unter diesen Bedingungen proportional dem jeweiligen Molekulargewicht.

Die Proben wurden vergleichsweise auch mit 0,1% beta-Mercaptoäthanol bei 56°C inkubiert, um durch zusätzliche Reduktion der Disulfidbrücken möglicherweise auftretende Polymere der Untereinheiten in Monomere zu spalten.

2.3.6.5.1. Lösungen

Lösung (1):

Acrylamid	20,0 g
Methylenbisacrylamid	0,52 g
SDS	0,20 g
TEMED	0,15 g

Natriumphosphat-Puffer 0,2 M pH 7,0	50,0 ml
H ₂ O bidest.	ad 100,0 ml

Lösung (2):

Ammoniumperoxodisulfat	0,15 g
Natriumphosphat-Puffer 0,2 M pH 7,0	50,0 ml
H ₂ O bidest.	ad 100,0 ml

Probenpuffer a (nicht reduzierend)

SDS	0,80 g
Natriumphosphat-Puffer 0,2 M pH 7,0	5,0 ml
Glycerin	50,0 ml
H ₂ O bidest.	ad 100,0 ml
Bromphenolblau	25,0 mg

Probenpuffer b (zur Reduktion der Disulfidbrücken)

SDS	0,80 g
Natriumphosphat-Puffer 0,2 M pH 7,0	5,0 ml
Glycerin	50,0 ml
beta-Mercaptoäthanol	0,4 ml
H ₂ O bidest.	ad 100,0 ml
Bromphenolblau	25,0 mg

Laufpuffer

SDS	2,0 g
Natriumphosphat-Puffer 0,2 M pH 7,0	1000 ml
H ₂ O bidest.	ad 2000 ml

2.3.6.5.2. Herstellung der Gele

Die Gelröhrchen (Länge 100 mm, Ø 5 mm) werden am unteren Ende mit Parafilm verschlossen und senkrecht in einen Ständer gestellt (14 Gele pro Elektrophoreselauf). Die Füllung erfolgt in allen Röhrchen bis 1,5 cm unterhalb des oberen Randes gleich hoch mit einer Mischung von 1 Vol. Lösung (1) und 1 Vol. Lösung (2).

Zur Erzielung einer glatten Oberfläche wird die Acrylamidlösung in den Röhrchen vor der Polymerisierung vorsichtig mit H_2O bi-dest. überschichtet. Die Polymerisationszeit beträgt ungefähr 15 - 20 Minuten.

2.3.6.5.3. Vorbereitung der Proben

Auf ein Gel werden als Probe entweder ein isoliertes Enzym (15 μg Protein), 5 Eichproteine (je 15 μg Protein) oder Enzym und Eichproteine zusammen aufgetragen.

Jede Probe wird sowohl unter reduzierenden als auch unter nicht reduzierenden Bedingungen angesetzt.

2.3.6.5.4. Eichproteine

Molekulargewicht (Dalton)

Cytochrom c	12 400
Myoglobin (Pferd)	17 800
Chymotrypsinogen A	25 000
Albumin (Hühnerei)	45 000
Albumin (Rinderserum)	67 000

2.3.6.5.5. Probenansätze

	Probenansatz a (nicht reduzierende Bedingungen)	Probenansatz b (reduzierende Bedingungen)
Probenlösung	10 µl - 120 µl	10 µl - 120 µl
Natriumphosphat-		
Puffer 0,01 M pH 7,0	ad 150 µl	ad 150 µl
Probenpuffer a / b	50 µl	50 µl
gut mischen	200 µl	200 µl
	2 Std Inkubation bei Zimmertempe- ratur (20 °C)	2 Std Inkuba- tion bei 56 °C

2.3.6.5.6. Elektrophorese

Nach dem Einsetzen der Gelröhrchen in die Elektrophoreseappara-
tur werden die Probelösungen auf die Gele pipettiert. Nach vor-
sichtigem Auffüllen mit Laufpuffer wird das Kammeroberteil
ebenso wie zuvor das Unterteil mit Laufpuffer gefüllt.

Die Stromstärke beträgt 7 mA pro Gel bei einer Spannung von
40 V, die Laufzeit 4 Std 30 min (20 °C Raumtemperatur). Am Ende
der Elektrophorese ist unter diesen Bedingungen die führende
Bromphenolblaubande ca. 1,5 cm über dem unteren Gelrand erkenn-
bar.

2.3.6.5.7. Färbung der Gele

1. Färbelösung:

Trichloressigsäure	100	g (= 20%)
H ₂ O bidest.	500	ml
Coomassie Brilliant Blau	1,25	g (= 0,25%)

2. Entfärbelösung:

Essigsäure 7%

Nach der Elektrophorese werden die Gele ca. 2 Stunden in Reagenzgläsern der Färbelösung ausgesetzt. Durch mehrmaliges Wechseln der Entfärbelösung werden die Gele in 48 bis 72 Stunden entfärbt.

2.3.6.5.8. Auswertung (112)

Durch Auftragen der bekannten Molekulargewichte der Eichproteine auf der Ordinate in logarithmischem Maßstab gegen deren Mobilität (Mittelwerte) auf der Abszisse in konventionellem Maßstab wird für jeden Elektrophoreselauf eine Eichgerade sowohl für das reduzierende als auch für das nicht reduzierende System berechnet.

Die Mobilität eines Proteins ist definiert:

$$\frac{\text{Mittlere Wanderungs-
strecke eines Proteins}}{\text{Länge des Gels nach
Entfärbung}} \times \frac{\text{Länge des Gels vor Färbung}}{\text{Wanderungsstrecke der
Bromphenolblaubande}}$$

Das unbekannte Molekulargewicht eines Proteins kann als Funktion der Mobilität an Hand der entsprechenden Eichkurve rechnerisch ermittelt werden.

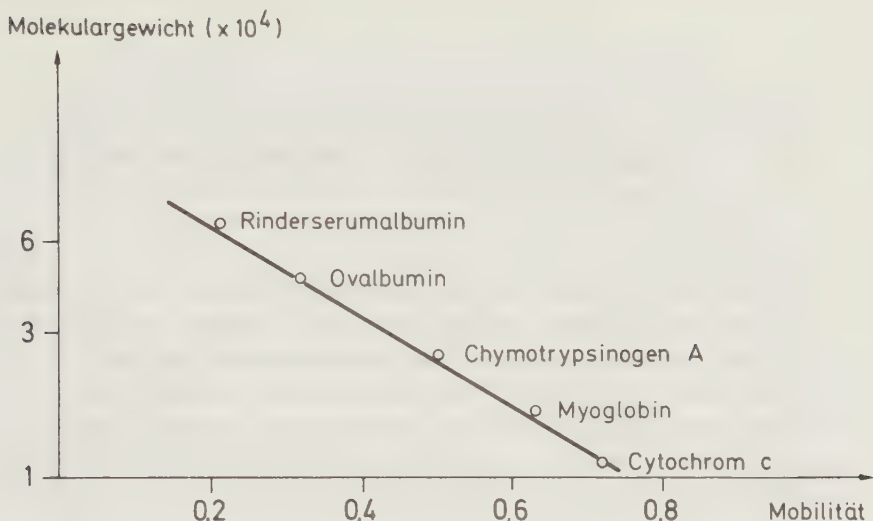


Abb. 18: Eichgerade der SDS-Polyacrylamid-Diskgelelektrophorese zur Molekulargewichtsbestimmung der gereinigten Cu/Zn Superoxiddismutasen.

Zur Erstellung der Eichgeraden wurden fünf Eichproteine (je 15 µg) auf ein SDS-Rundgel (1 % SDS) aufgetragen: Cytochrom c (12400 Dalton), Myoglobin (17800 Dalton), Chymotrypsinogen (25000 Dalton), Albumin vom Hühnerei (45000 Dalton) und Albumin aus Rinderserum (67000 Dalton).

Elektrophoresebedingungen: Stromstärke 7 mA/Gel, Spannung 50 V
Laufzeit 4 1/2 Stunden

Abszisse: Mobilität, definiert als

$$\frac{\text{mittl. Wanderungsstrecke eines Proteins}}{\text{Länge des Gels nach Entfärben}} \times \frac{\text{Länge des Gels vor Färbung}}{\text{Wanderungsstrecke der Bromphenolblaubande}}$$

Ordinate: Logarithmus des Molekulargewichts (Dalton x 10⁴).
Bei jedem Elektrophoreselauf wurde je eine Eichgerade unter reduzierenden (mit 0,1 % Mercaptoäthanol) und unter nicht reduzierenden Bedingungen (ohne Mercaptoäthanol) erstellt.

Korrelation der Eichgerade: -0,998

3. E R G E B N I S S E

3.1. Superoxiddismutase-Gesamtaktivität in Leukocyten gesunder Spender und an Lymphom erkrankter Patienten

Die Superoxiddismutase-Gesamtaktivität in Lymphocyten und Granulocyten aus peripherem Blut gesunder Spender wurde quantitativ mit der Aktivität in den entsprechenden Zellpopulationen von Patienten verglichen, welche an einem lymphoplasmocytoiden Lymphom erkrankt waren. Es handelt sich bei dieser Erkrankung um ein malignes Non-Hodgkin Lymphom von niedrigem Malignitätsgrad, das mit einer Entartung von B-Lymphocyten einhergeht (60, 91, 103).

3.1.1. Untersuchungen an Lymphocyten

Gemäß dem beschriebenen Verfahren (siehe Mat. und Methoden 2.3.2.) zur Präparation von Leukocyten wurden aus 40 ml peripherem Blut von gesunden Spendern (n=6) Lymphocyten gewonnen. Auf die gleiche Weise wurden von Patienten (n=5), bei denen aufgrund klinisch-hämatologischer Befunde die Diagnose eines lymphoplasmocytoiden Lymphoms gestellt worden war, Lymphocyten aus dem peripheren Blut isoliert. Vier der Patienten wiesen im Normbereich liegende Leukocytenzahlen im peripheren Blut auf; von einem Patienten (Patient W.So., m.) wurde Blut in einer leukämischen Phase der Erkrankung untersucht. Dieser Patient litt bei einer hochgradigen Ausschwemmung von lymphoplasmocytoiden Zellen an einer ausgeprägten Granulocytopenie, so daß aus seinem

Blut im Gegensatz zu den vier anderen Patienten keine ausreichende Zahl an Granulocyten präpariert werden konnte (siehe 3.1.2.).

Die Ausbeute an Lymphocyten lag im Durchschnitt bei 40 - 50 % der Ausgangszellzahl. Die Zellkonzentration wurde jeweils auf $2 - 5 \times 10^7$ Lymphocyten/ml eingestellt. Gefärbte Ausstriche zeigten in der Lymphocytenpopulation keine Erythrocyten; Monoocyten waren bis zu einem Anteil von maximal 5 % enthalten.

Die 1 Stunde nach der Präparation durch Färbung mit Trypanblau durchgeführte Vitalitätskontrolle ergab in jedem Fall, daß über 95 % der Zellen intakt waren. Nach Sonifikation wurde der durch Zentrifugation bei 11500 g gewonnene Überstand der Zellhomogenate bei -30°C eingefroren und bis zur Bestimmung des Proteingehaltes nach der Methode von Lowry (64) sowie der Superoxiddismutase-Aktivität aufbewahrt (maximal 4 Monate). Der quantitative Aktivitätsnachweis erfolgte vergleichend mit dem Cytochrom c - Reduktionshemmtest und dem Nitritformationshemmtest (siehe Mat. und Methoden 2.3.4.1./2.). Die Hämoglobinbestimmung im Zellhomogenatüberstand (mg/100 μ l) war negativ und entspricht der morphologischen Beurteilung der Zellpräparation.

Aus der tabellarischen Übersicht der Meßergebnisse läßt sich erkennen, daß sowohl hinsichtlich des auf die Zellzahl bezogenen Proteingehaltes als auch im Hinblick auf die Superoxiddismutase-Aktivität, bezogen auf den Proteingehalt und auf die Zellzahl, die Streubereiche der Werte von beiden verglichenen Gruppen sich in jedem Fall überschneiden. Für die gemessenen Parameter ergibt sich daher kein Unterschied zwischen den beiden untersuchten Gruppen.

Beim Vergleich der Testverfahren zur Bestimmung der Superoxiddismutase-Aktivität fällt auf, daß die im Nitritformationshemmtest gemessenen Werte um den Faktor 1,3 - 1,9 höher als die entsprechenden im Cytochrom c - Reduktionshemmtest erhaltenen Werte liegen.

Gesunde Spender	Proteinkonzentration* ($\mu\text{g}/10^6$ Zellen)	Superoxiddismutase - Aktivität*		
		Nitritformationshemttest (U/mg Prot.)	Nitritformationshemttest (U/ 10^7 Zellen)	Cytochrom c-Red.hemttest (U/ 10^7 Zellen)
E.K., w., 27 J.	70	13,6	10,0	---
S.P., m., 23 J.	42	11,6	4,8	8,0
G.G., m., 24 J.	98	12,3	12,0	6,4
R.Z., m., 24 J.	64	13,2	8,2	6,3
R.H., w., 18 J.	50	---	---	9,7
A.L., w., 20 J.	70	12,7	8,9	---
$\bar{x}$ (n = 6)	66 (± 19)**	12,7 ($\pm 0,78$)**	8,8 ($\pm 2,65$)**	7,6 ($\pm 1,60$)**
Patienten				
E.B., w., 66 J.	63	14,4	9,1	11,5
F.M., w., 71 J.	80	11,2	8,9	7,1
L.B., m., 70 J.	77	12,7	9,9	7,6
K.S., w., 72 J.	45	15,4	7,0	---
W. So., m., 67 J., Leukämische Phase	38	11,7	4,6	11,5
$\bar{x}$ (n = 5)	61 (± 19)**	13,1 ($\pm 1,79$)**	7,9 ($\pm 2,13$)**	9,4 ($\pm 2,40$)**
$\bar{x}$ (gesamt: n = 11)	63 (± 18)	12,9 ($\pm 1,31$)	8,2 ($\pm 2,31$)	8,5 ($\pm 2,13$)
				5,2 ($\pm 1,32$)

* Angegeben sind die jeweiligen Mittelwerte der Einzelbestimmungen.

** Angegeben ist der Mittelwert der (n) Einzeluntersuchungen.

Die in Klammern angegebenen Werte entsprechen der Standardabweichung.

3.1.2. Untersuchungen an Granulocyten

Von 5 gesunden Spendern, aus deren Blut auch Lymphocyten präpariert wurden (siehe 3.1.1.), wurden mittels Percoll-Dichtegradientenzentrifugation im selben Präparationsgang Granulocyten gewonnen (n=5).

Diesen Spendern wurden 4 Patienten mit lymphoplasmocytoidem Lymphom aus der in 3.1.1. beschriebenen Gruppe gegenübergestellt. Als Ausgangsmaterial für die Präparation von Granulocyten und Lymphocyten dienten auch in der Patientengruppe (n=4) dieselben Blutproben.

Die Ausbeute an Granulocyten betrug im Durchschnitt 50 - 60 % der Ausgangszellzahl.

Ebenso wie bei den Lymphocyten wurde eine Zellkonzentration von $2 - 5 \times 10^7$ Granulocyten/ml eingestellt.

Die Granulocytenpopulationen enthielten in gefärbten Ausstrichen maximal 5 % mononukleäre Zellen. Erythrocyten waren nicht zu erkennen.

Die Vitalität der präparierten Granulocyten - sie wurde 1 Stunde nach der Präparation durch Färbung mit Trypanblau untersucht - lag jeweils zwischen 95 und 100 % der gesamten Population.

Zur Bestimmung des Gehaltes an Protein und Hämoglobin sowie der Superoxiddismutase-Aktivität in Granulocyten fanden dieselben Nachweisverfahren wie bei den Untersuchungen an Lymphocyten Verwendung (siehe 3.1.1.).

Die in der Tabelle zusammengefaßten Meßergebnisse lassen bei den untersuchten Granulocyten - ähnlich wie im Falle der Lymphocyten - keinen Unterschied zwischen gesunden Spendern und Patienten deutlich werden. Dies gilt sowohl für den Proteingehalt als auch für die Superoxiddismutase-Aktivität.

Der Vergleich zwischen der in Lymphocyten und Granulocyten ermittelten Superoxiddismutase-Aktivität zeigt, auf Protein wie auch auf Zellzahl bezogen, bei der Lymphocytenpopulation 2 - 3fach höhere Werte als bei der Granulocytenpopulation.

3.1.2.1. Tabelle: Granulocyten gesunder Spender und an lymphoplasmacytoidem Lymphom erkrankter Patienten

Gesunde Spender	Proteinkonzentration* ($\mu\text{g}/10^6$ zellen)	Superoxiddismutase - Aktivität*		
		Nitritformationshemmtest (U/mg Prot.)	(U/ 10^7 zellen)	Cytochrom c-Red.hemmtest (U/ 10^7 zellen)
S.P., m., 23 J.	74	5,3	3,9	2,7
G.G., m., 24 J.	99	5,2	5,1	4,5
R.Z., m., 24 J.	79	3,7	2,9	2,4
R.H., w., 18 J.	87	4,6	4,0	5,4
A.L., w., 20 J.	89	5,2	4,6	4,4
$\bar{x}$ (n = 5)	86 (± 10)	4,8 ($\pm 0,68$)	4,1 ($\pm 0,83$)	3,9 ($\pm 1,28$)
Patienten				
E.B., w., 66 J.	78	7,0	5,5	5,0
F.M., w., 71 J.	66	3,5	2,3	2,3
L.B., m., 70 J.	65	3,5	2,3	2,9
K.S., w., 72 J.	54	3,7	2,0	3,7
$\bar{x}$ (n = 4)	66 (± 10)	4,4 ($\pm 1,72$)	3,0 ($\pm 1,66$)	3,5 ($\pm 1,17$)
$\bar{x}$ (gesamt: n = 9)	77 (± 14)	4,6 ($\pm 1,17$)	3,6 ($\pm 1,30$)	3,7 ($\pm 1,17$)

* Angegeben sind die jeweiligen Mittelwerte der Einzelbestimmungen.

** Angegeben ist der Mittelwert der (n) Einzeluntersuchungen.

Die in Klammern angegebenen Werte entsprechen der Standardabweichung.

3.2. Isolierung der Cu/Zn Superoxiddismutase aus normaler Milz und aus Lymphom-Milz des Menschen

Die praktische Durchführung sowie die Ergebnisse der Enzymisolierung aus menschlicher Normal-Milz und aus Lymphom-Milz werden vergleichend dargestellt. Alle Reinigungsschritte erfolgten - falls nicht anders angegeben - im Kühlraum bei 4 °C.

3.2.1. Gewinnung des Ausgangsmaterials

Das präparative Arbeiten für die Isolierung des Enzyms Cu/Zn Superoxiddismutase aus menschlichem Normal-Milzgewebe erfordert ca. 1500 g (Feuchtgewicht) Ausgangsmaterial. Das Gewicht einer normalen Milz des Menschen beträgt ca. 150 g bis 200 g. Daher wurden für die Isolierung insgesamt 15 Milzen im Laufe von 6 Monaten gesammelt. Die einzelnen Milzen, welche freundlicherweise aus dem Operationsgut der Chirurgischen Klinik (Universität München, Klinikum Großhadern) überlassen wurden, stammten von Patienten, die im Rahmen einer erweiterten Magenresektion splenektomiert wurden. Jeweils unmittelbar nach der operativen Entfernung wurde die Milz auf Eis gekühlt und ca. 15 bis 30 min später mit der präparativen Aufarbeitung begonnen.

In den jeweiligen histologischen Befunden wurden alle 15 verwerteten Milzen als unauffällig beschrieben.

Für die Isolierung von Cu/Zn Superoxiddismutase aus Lymphom-Milz diente als Ausgangsmaterial das operativ entfernte Milzgewebe einer an einem malignen Non-Hodgkin Lymphom (Lymphoplasmocytoides Immunocytom) erkrankten Patientin (60, 91, 103). In für den splenomegalen Typ dieser Erkrankung, deren Diagnose aus der klinischen Symptomatik und den hämatologischen Befunden ge-

stellt wurde, charakteristischer Weise, zeigte sich bei dieser Patientin eine enorme Milzvergrößerung (OP-Milzgewicht von 3500 g) aufgrund einer - wie das histologische Gutachten ergab - ausgedehnten Infiltration durch entartete lymphatische Zellen. Im Hinblick auf die Menge des Lymphomgewebes stellte diese aus therapeutischen Gründen operativ entfernte Milz ein ideales Untersuchungsmaterial dar. Ebenso wie die Normal-Milzen wurde die Lymphom-Milz sofort nach ihrer Entnahme übernommen und 15 bis 30 min später unter Eiskühlung der präparativen Aufarbeitung zugeführt.

3.2.2. Präparative Aufarbeitung des Milzgewebes

Die frisch entnommene Milz wurde jeweils gründlich mit kalter (4°C) physiologischer NaCl-Lösung zum Zwecke der weitgehenden Entfernung von Blutresten gewaschen. Die dünne blau-graue Kapsel der Normal-Milzen ließ sich leicht abpräparieren. Von der Lymphom-Milz wurde eine derbe, verdickte Kapsel entfernt. Daraufhin wurden die Milzen in kleine Stücke geschnitten und bei -70 °C eingefroren. Auf der Schnittfläche der Lymphom-Milz war bereits makroskopisch eine diffuse Aussaat von weißen Knötchen erkennbar.

3.2.3. Gewinnung des Rohhomogenats

Das eingefrorene Gewebe wurde aufgetaut, die 15 Normal-Milzen wurden gepoolt.

Je 200 g Milzgewebe wurden bei 4°C mit ca. 250 ml H₂O bidest. aufgeschwemmt und in einem Star-Mix bei 5000 U/min 3 Minuten lang homogenisiert. Auf diese Weise wurden bei der Normal-Milz insgesamt 4000 ml eines dickflüssig-breiigen Rohhomogenats von rotbrauner Farbe, bei der Lymphom-Milz 5500 ml eines vergleichbaren Rohhomogenats gewonnen.

Im Anschluß wurde das Rohhomogenat 30 min bei 13000 g (= 12000 RPM; Sorvall RC-5 Zentrifuge; GSA-Rotor) und 4°C ohne Bremse abzentrifugiert. Der klare, dunkelrote Homogenat-Überstand (Normal-Milz: Vol. 2100 ml; Lymphom-Milz: Vol. 3250 ml) wurde in einem 5 Liter-Becherglas gesammelt.

3.2.4. Fällung des Hämoglobins nach der Tsuchihashi-Methode (109)

Der Homogenat-Überstand wurde mit 0,25 Vol.-Teilen Äthanol und 0,15 Vol.-Teilen Chloroform versetzt und ca. 25 min lang bei 4°C gerührt. Die ockerfarbene, dickflüssige Suspension (Normal-Milz: Vol. 2800 ml; Lymphom-Milz: Vol. 4700 ml) wurde zur Abtrennung des gefällten Hämoglobins 15 min lang bei 13000 g (= 12000 RPM; Sorvall RC-5 Zentrifuge; GSA-Rotor) und 4°C ohne Bremse zentrifugiert.

In einem 3 Liter-Becherglas gesammelt und weiter verwertet wurde der cognacfarbene, klare Äthanol-Überstand (Normal-Milz: Vol. 2200 ml; Lymphom-Milz: Vol. 3500 ml), während die gelblich-klare, chloroformreiche untere Flüssigkeitsphase, die teilweise unter dem Hämoglobin-Pellet eingeschlossen vorlag, verworfen wurde.

3.2.5. Hämoglobinbestimmung

Die Hämoglobinkonzentrationen wurden jeweils im Homogenat-Überstand vor der Hämoglobinfällung und im Äthanol-Überstand nach der Hämoglobinfällung bestimmt. Die Berechnung der Konzentrationen erfolgte über eine Eichgerade (siehe Mat. und Methoden 2.3.1.4.).

Tabelle: Hämoglobingehalt

	Normal-Milz		Lymphom-Milz	
	Hb-Konz. (g/100 ml)	Gesamt-Hb (g)	Hb-Konz. (g/100 ml)	Gesamt-Hb (g)
Homogenat- Überstand	2,6	55	0,9	30
Äthanol- Überstand	0	0	0	0

3.2.6. Salzfällung

Der Äthanol-Überstand wurde bei Zimmertemperatur (20°C) ca. 30 min lang stehengelassen. Unter Rühren bei 20°C wurde festes, wasserfreies Di-Kaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4) entsprechend einer Konzentration von 300 mg/ml zugegeben (Normal-Milz: 660 g K_2HPO_4 ; Lymphom-Milz: 1050 g K_2HPO_4) und bis zur vollständigen Lösung des Salzes ca. 25 min lang weitergerührt. Anschließend wurde die gelbbraune, trübe Lösung in einen 5 Liter fassenden Scheidetrichter gefüllt, gut geschüttelt und bis zur Phasentrennung ca. 60 min bei 20°C stehengelassen.

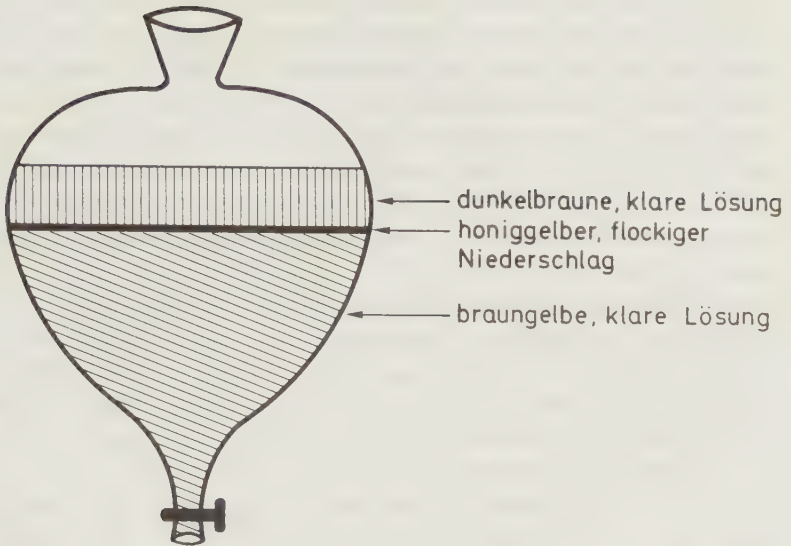


Abb. 19: Erklärung siehe Text.

Die untere Chloroform-/Salzphase wurde verworfen; die obere äthanolreiche Phase mit dem flockigen Niederschlag wurde bis zur Phasengrenze gesammelt (Normal-Milz: Vol. 1000 ml; Lymphom-Milz: Vol. 1470 ml) und auf 4°C gekühlt. Durch 30 minütige Zentrifugation bei 13000 g (= 12000 RPM; Sorvall RC-5 Zentrifuge; GSA-Rotor) erhielt man einen cognacfarbenen, klaren Überstand (Normal-Milz: Vol. 800 ml; Lymphom-Milz: Vol. 1250 ml), welcher jeweils vorsichtig von dem hellbraunen Pellet und einer blasenförmig darunter eingeschlossenen Chloroform-Schicht dekantiert wurde.

3.2.7. Acetonfällung

Die in einem Becherglas gesammelte Äthanolphase wurde langsam unter Rühren mit 2 Vol.-Teilen -20°C kalten Acetons versetzt. Dabei kam es zum Ausfallen eines bräunlichen Niederschlages. Die braungelbe Suspension wurde ca. 40 min stehengelassen und der Niederschlag anschließend nach Abgießen des Überstandes bei 13000 g (= 12000 RPM; Sorvall RC-5 Zentrifuge; GSA-Rotor) und 4°C 15 min lang abzentrifugiert. Die dadurch erhaltenen Pellets wurden in 105 ml (Normal-Milz) bzw. 150 ml (Lymphom-Milz) Natriumacetat-Puffer (0,015 M; pH 5,0; Leitfähigkeit 0,7 mmho) gelöst. Die in einen Dialyseschlauch (Ausschlußgrenze 20000 Dalton) gefüllte tiefbraune Lösung wurde gegen 25 l des gleichen NaAc-Puffers in 5 Durchgängen gegen je 5 l Puffer über je 8 Stunden (insges. 40 Stunden) dialysiert. Die Dialyse diente der Eliminierung von Aceton- und Chloroformrückständen.

Im Verlauf der Dialyse kam es im Dialyseschlauch zum Ausfallen eines weißlich-flockigen Niederschlages. Nach der Zentrifugation des Dialysates (Normal-Milz: Vol. 180 ml; Lymphom-Milz: Vol. 210 ml) bei 13500 g (= 12000 RPM; Sorvall RC-5 Zentrifuge; SS 34 - Rotor) über 15 min wurde der dunkelbraune, klare Überstand bei 4°C aufbewahrt.

3.2.8. Kationenaustauschchromatographie im diskontinuierlichen Verfahren (Batch-Verfahren)

Ca. 10 g trockene Carboxymethylcellulose (Sephadex CM 50) wurden mit etwa 500 ml Dialysepuffer (0,015 M NaAc; pH 5,0; Leitfähigkeit 0,7 mmho) gequollen und 24 Stunden lang bei mehrfachem Pufferwechsel äquilibriert.

Das Dialysat wurde in ca. 260 ml äquilibrierten Ionenaustauscher vorsichtig eingerührt. Während des anschließenden Rührens bei

4 °C über etwa 2 1/2 Stunden war eine weitgehend quantitative Bindung der bei pH 5,0 bindungsfähigen Proteine an den Kationenaustauscher anzunehmen.

Nicht gebundene Proteine wurden durch Waschen der äquilibrierten Suspension mit 0,015 M NaAc-Puffer auf einer Nutsche (Ø 12 cm) entfernt. Es wurde so lange gewaschen, bis die Extinktion der Waschlösung bei $A_{280 \text{ nm}}$ auf 0,015 gesunken war.

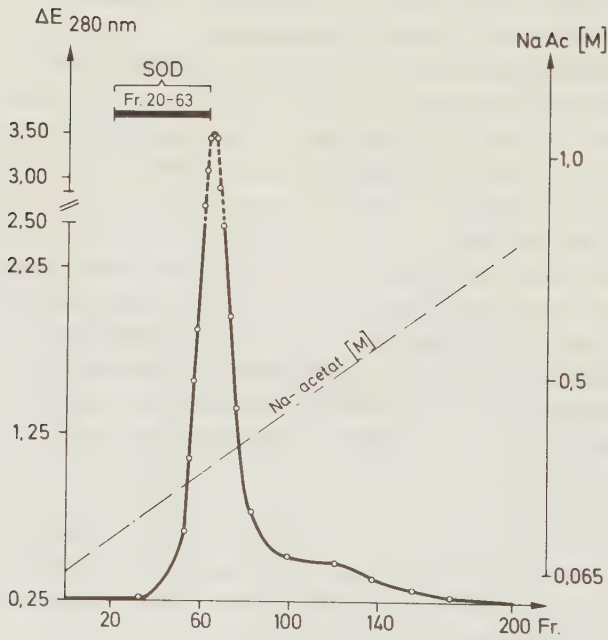
Daraufhin wurde der Protein-beladene Kationenaustauscher (Normal-Milz: Vol. ca. 350 ml; Lymphom-Milz: Vol. ca. 300 ml) in eine Chromatographie-Säule (Länge 70 cm; Ø 2,6 cm) gefüllt und mit zweifachem (Normal-Milz) bzw. dreifachem Säulenvolumen (Lymphom-Milz) des 0,015 M NaAc-Puffers äquilibriert.

Es schloß sich die Elution mit einem linearen NaAc-Gradienten von 0,015 M (pH 5,0; Leitfähigkeit 0,7 mmho) bis 0,065 M (pH 5,0; Leitfähigkeit 2,8 mmho) an. Wie bei der folgenden Gradienten-Elution wurde die Flußrate durch Einsatz einer peristaltischen Pumpe konstant bei 75 ml/Std gehalten. Die Extinktion der Eluat-Fraktionen (Vol. 8 ml) wurde bei $A_{254 \text{ nm}}$ und $A_{280 \text{ nm}}$ fortlaufend gemessen (LKB Fraktionssammler).

Die Elution mit dem NaAc-Gradienten von 0,015 M bis 0,065 M führte bei keiner der beiden Isolierungen zu einer meßbaren Desorption von Protein.

Deshalb wurde die Elution mit einem zweiten linearen NaAc-Gradienten von 0,065 M (pH 5,0; Leitfähigkeit 2,8 mmho) bis 1,0 M (pH 5,0; Leitfähigkeit 30 mmho) fortgesetzt. Infolge des Anstiegs der Ionenstärke schrumpfte das Säulenvolumen auf ca. 1/4 des Ausgangsvolumens.

Abb. 20 (A)



Legende siehe nächste Seite

Abb. 20 (B)

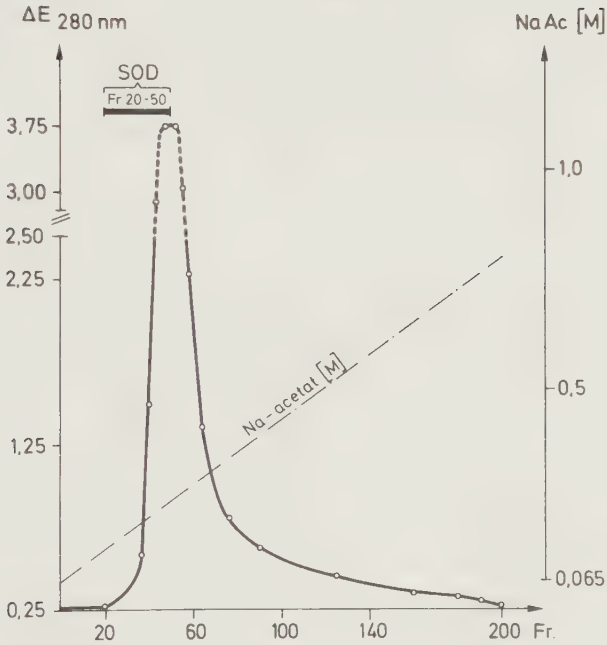


Abb. 20 (A) und (B): Elutionsdiagramme der CM 50-Chromatographie von Normal-Milz (A) und Lymphom-Milz (B). Elution durch linearen NaAc-Gradienten von 0,065 M (pH 5,0; Leitfähigkeit 2,8 mmho) bis 1,0 M (pH 5,0; Leitfähigkeit 30 mmho). Die Einzelaktionen (Normal-Milz: Vol. 8,0 ml; Lymphom-Milz: Vol. 8,8 ml) wurden auf ihren Proteingehalt ($A_{280\text{ nm}}$) und ihre Superoxiddismutase-Aktivität (SOD) untersucht (siehe Mat. und Methoden 2.3.4.3.1. und 2.3.6.1.).

Die Hauptaktivität der Superoxiddismutase ließ sich bei der Normal-Milz in den Fraktionen 20 - 63, bei der Lymphom-Milz in den Fraktionen 20 - 50 nachweisen (in den Fraktionen 50 - 200 war nur sehr geringe Aktivität erkennbar).

Welche SOD-aktiven Fraktionen gepoolt werden sollten, wurde von einer Analyse der Fremdproteine abhängig gemacht. Zur Untersuchung des Proteinmusters diente die isoelektrische Fokussierung (siehe Mat. und Methoden 2.3.6.1.).

Abb. 21 (A): Text siehe nächste Seite.

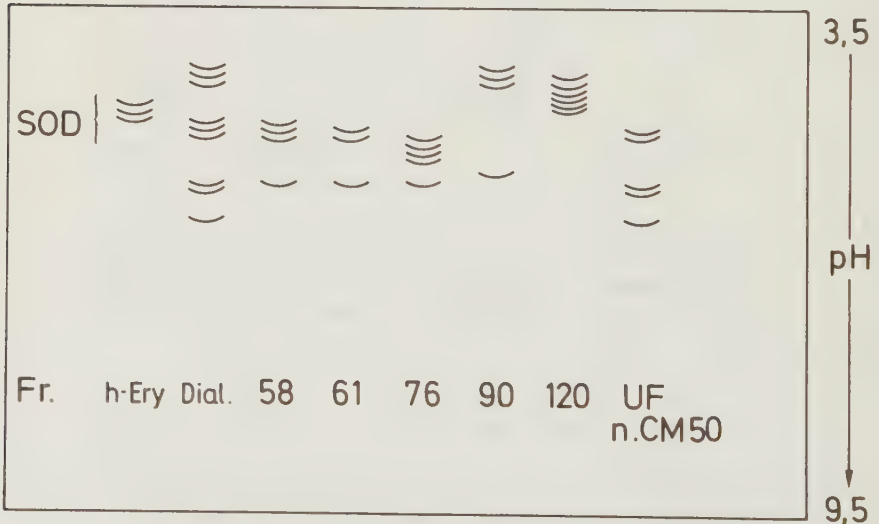


Abb. 21 (B)

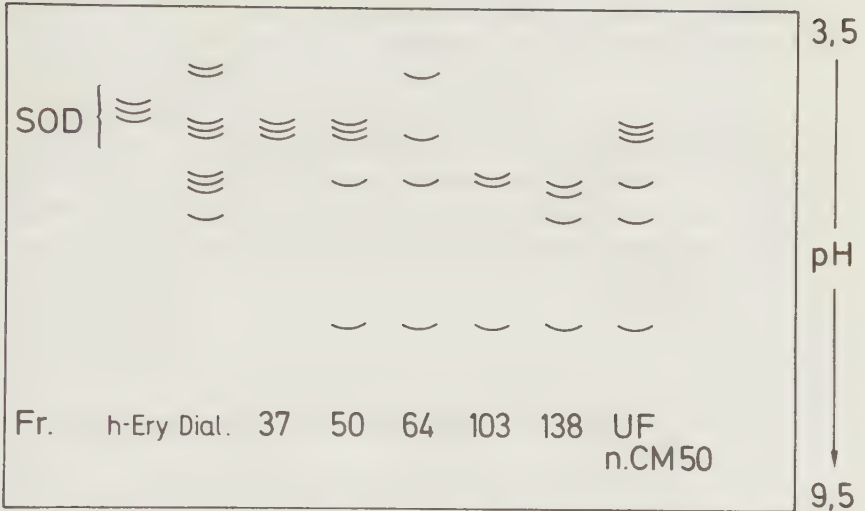


Abb. 21 (A) und (B): Isoelektrische Fokussierung auf Polyacrylamidgel (PAG-plate, pH 3,5 - 9,5) der angegebenen Eluatfraktionen und der Ultrafiltrate der gepoolten Fraktionen nach CM 50 - Chromatographie von Normal-Milz (A) und Lymphom-Milz (B). Zum Vergleich wurden das Dialysat nach Acetonfällung (siehe 3.2.7.) sowie gereinigte Cu/Zn Superoxiddismutase aus Human-Erythrocyten (h-Ery) mitgeführt. Elektrophoresedauer: 1,5 Std. mit konstanter Leistung von 30 Watt.

Anodenlösung: 1 M H_3PO_4 ; **Kathodenlösung:** 1 M NaOH

Ein Teil des Gels wurde im Anschluß an die Elektrophorese fixiert und mit Coomassie Brilliant Blue zur Proteindarstellung gefärbt (siehe Mat. und Methoden 2.3.6.1.). Der andere Teil des Gels diente zum Nachweis von Superoxiddismutase-Aktivität, welche mittels Hemmung der photochemischen Reduktion von Nitrotetrazoliumblau (NBT) dargestellt wurde. Dazu wurde das Gel zuerst für 20 min in $2,45 \times 10^{-3}$ M NBT und anschließend 15 min in einer Lösung ($0,028$ M Tetramethyläthylendiamin, $2,8 \times 10^{-3}$ M Riboflavin, $0,036$ M KPO_4 -Puffer, pH 7,8) inkubiert. Nach der darauf folgenden 15-minütigen Bestrahlung mit UV-Licht konnte die Superoxiddismutase-Aktivität in Form achromatischer Banden auf dem Gel lokalisiert werden (siehe Mat. und Methoden 2.3.4.3.1.).

Der Vergleich des Ultrafiltrats (UF n. CM 50 in Abb. 21(A) und (B)) der gepoolten Fraktionen nach CM 50 - Chromatographie mit dem Dialysat nach Acetonfällung (Dial. in Abb. 21(A) und (B)) zeigt, daß ein Abtrennen sämtlicher Fremdproteine, deren isoelektrische Punkte einen niedrigeren pH-Wert als die Superoxid-dismutase-aktiven Banden aufweisen, erreicht wurde.

Die Fraktionen 20 - 63 (insgesamt ca. 320 ml) der Normal-Milz und die Fraktionen 20 - 50 (insgesamt ca. 270 ml) der Lymphom-Milz wurden gepoolt und durch eine Amicon YM 10 Ultrafiltrationsmembran (Ausschlußgrenze 10000 Dalton) auf ein Volumen von 11 ml bzw. 12 ml konzentriert. Das Ultrafiltrat wies jeweils eine goldgelbe Färbung auf.

3.2.9. Gelfiltrationschromatographie

100 g trockenes Sephadex G-75 wurden in 1800 ml Puffer (0,1 M KCl, 0,005 M K_2HPO_4 , 1×10^{-5} M EDTA, 0,1 % beta-Mercaptoäthanol, pH 7,8; Leitfähigkeit 13 mmho) ca. 40 Stunden bei Raumtemperatur (20 °C) unter mehrmaligem Wechseln des Puffers gequollen und äquilibriert.

Nachdem das äquilibrierte Sephadex G-75 (Vol. 1800 ml) 20 min lang entgast worden war, wurde es in eine Chromatographie-Säule (Länge 100 cm; Ø 5,0 cm) gefüllt und mit ungefähr 3 Säulenvolumina (5,5 l) obigen Puffers bei einem hydrostatischen Druck von 100 cm Wassersäule äquilibriert.

Das mit 2 Teilen Puffer auf ca. 30 ml verdünnte Ultrafiltrat der CM 50-Elution wurde auf die glatte Oberfläche des Sephadex G-75 Gels aufgetragen.

Die Elution erfolgte mit obigem Puffer bei konstanter Durchflußrate von 75 ml/Std. Bei der Normal-Milz wurden 200 Einzelfraktionen mit einem Volumen von je 8,2 ml (insges. ca. 1650 ml),

bei der Lymphom-Milz 190 Fraktionen gleichen Volumens (insges. ca. 1550 ml) erhalten.

Der Elutionsverlauf wurde durch die Messung der Extinktion bei $A_{254 \text{ nm}}$ und $A_{280 \text{ nm}}$ verfolgt.

Abb. 22 (A): Text siehe nächste Seite.

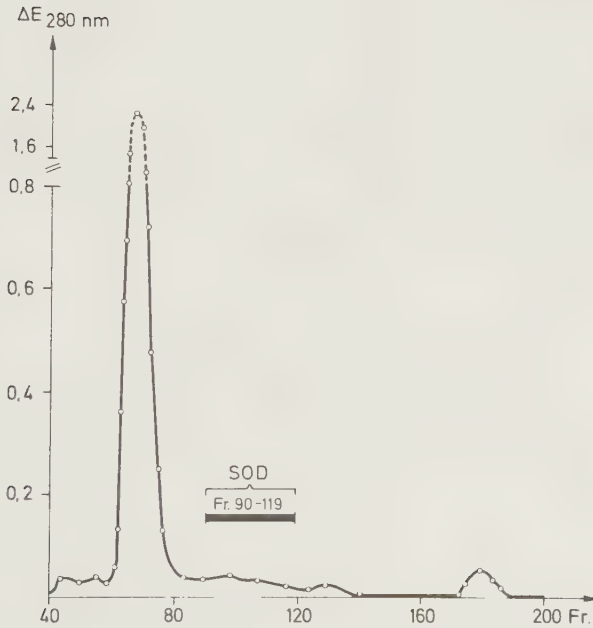


Abb. 22 (B) :

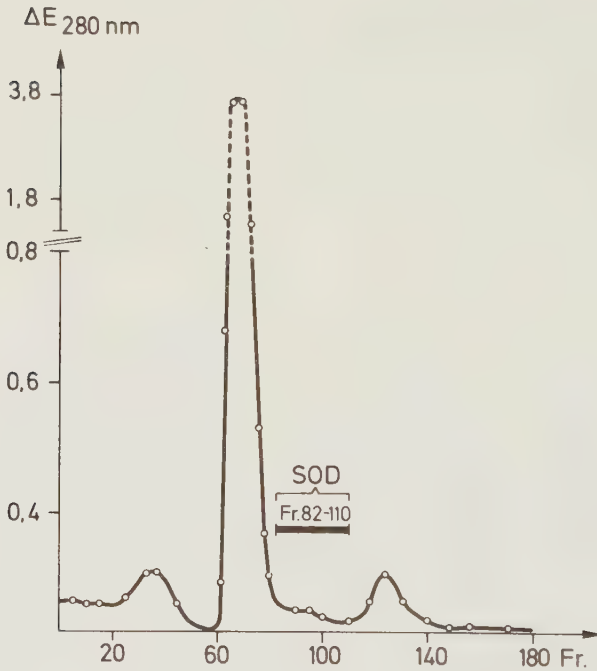


Abb. 22 (A) und (B): Elutionsdiagramme der Sephadex G 75-Chromatographie von Normal-Milz (A) und Lymphom-Milz (B) nach Elution mit Puffer (0,1 M KCl, 0,005 M K_2HPO_4 , 1×10^{-5} M EDTA, 0,1 % beta-Mercaptoäthanol, pH 7,8; Leitfähigkeit 13 mmho). Die Einzel-fractionen (Vol. 8,2 ml) wurden auf Proteingehalt ($A_{280 \text{ nm}}$) und Superoxiddismutase-Aktivität (SOD) untersucht (siehe Legende zu Abb. 20).

Superoxiddismutase-Aktivität wiesen bei der Normal-Milz die Fraktionen 90 - 119, bei der Lymphom-Milz die Fraktionen 82 - 110 auf.

Die Proteinanalyse in ausgewählten Eluatfraktionen erfolgte mittels isoelektrischer Fokussierung (siehe Mat. und Methoden 2.3.6.1.).

Abb. 23 (A): Text siehe nächste Seite.

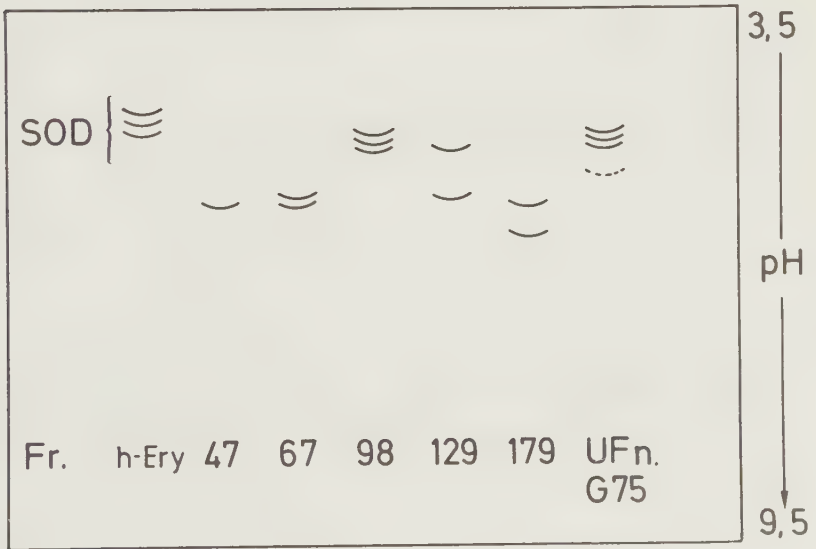


Abb. 23 (B)

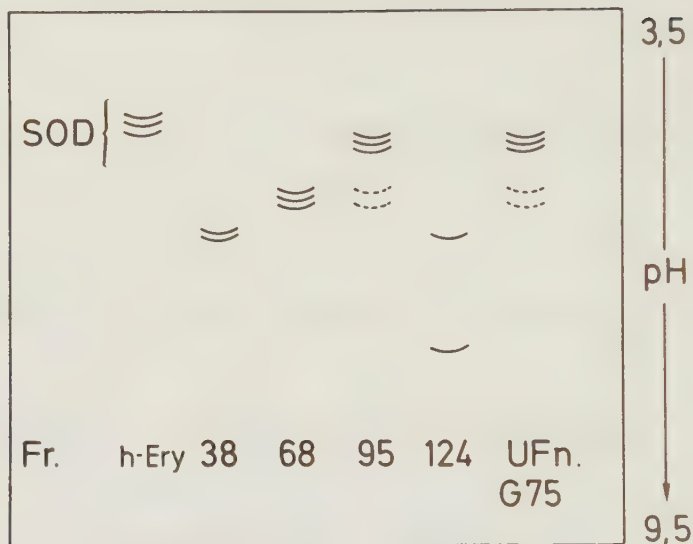


Abb. 23 (A) und (B): Isoelektrische Fokussierung auf Polyacrylamidgel (PAG-plate, pH 3,5 - 9,5) der angegebenen Eluatfraktionen und der Ultrafiltrate der gepoolten Fraktionen nach Sephadex G 75-Säulenchromatographie von Normal-Milz (A) und Lymphom-Milz (B). Zum Vergleich wurde gereinigte Cu/Zn Superoxiddismutase aus Human-Erythrocyten (h-Ery) aufgetragen (siehe Legende zu Abb. 21).

Die Gelfiltration ermöglichte ein Abtrennen der Fremdproteine, deren isoelektrische Punkte in einem höheren pH-Bereich liegen als die der Superoxiddismutase-aktiven Banden. Sowohl bei der Normal-Milz als auch bei der Lymphom-Milz wurden früh eluierbare (s. IEF Fr. 47 und 67 bzw. 38 und 68) als auch spät eluierbare

Fremdproteine (s. IEF Fr. 179 bzw. 124) im Vergleich zu den Superoxiddismutase-aktiven Banden durch Gelfiltration abgetrennt. Unter Berücksichtigung dieser Befunde der isoelektrischen Fokussierung und der Elutionsdiagramme wurden die Fraktionen 90 - 119 (insgesamt ca. 245 ml) der Normal-Milz und die Fraktionen 82 - 110 (insgesamt ca. 245 ml) der Lymphom-Milz vereinigt. Die Ultrafiltration der gepoolten Fraktionen durch eine Amicon YM 10 Ultrafiltrationsmembran (Ausschlußgrenze 10000 Dalton) ergab 8 ml (Normal-Milz) bzw. 10 ml (Lymphom-Milz) einer schwach gelben Lösung.

3.2.10. Anionenaustauschchromatographie

Für die Anionenaustauschchromatographie mit Diethylaminoethyl (DEAE A 50) wurde nur ein Teil des Ultrafiltrats nach G-75 Gelfiltrationschromatographie eingesetzt (Normal-Milz: Vol. 6 ml; Lymphom-Milz: Vol. 4 ml). Dieser Teil wurde zur Angleichung der Eigenschaften des Lösungspuffers an die Pufferbedingungen des DEAE A 50-Chromatographielaufs mit 20 - 25 ml $5 \times 10^{-3} \text{M}$ KPO_4 -Puffer (pH 7,0; Leitfähigkeit 1,1 mmho) durch eine Amicon YM 10 Membran (Ausschlußgrenze 10000 Dalton) diafiltriert.

Zunächst wurden 5 g trockenes Sephadex DEAE A 50 in 70 ml 0,1 M KPO_4 -Puffer (pH 7,0; Leitfähigkeit 2,9 mmho) gequollen und über 12 Std. unter mehrmaligem Wechseln des Puffers bei 20 °C äquilibriert.

Ebenso wurden 5 g trockenes Sephadex G-25 (Coarse) in 25 ml $5 \times 10^{-3} \text{M}$ KPO_4 -Puffer (pH 7,2; Leitfähigkeit 1,07 mmho) gequollen und über 12 Std. bei 20 °C äquilibriert.

In eine kleine Chromatographiesäule (Länge 15 cm; $\varnothing$ 0,9 cm) wurden zuerst ca. 1 - 2 ml gequollenes Sephadex G-25 gegeben, um ein Trockenlaufen der Säule im Ausflußbereich und ein Verstopfen der Fritte zu verhindern.

Über das Sephadex G-25 wurden vorsichtig ca. 3 ml der äquili-
brierten DEAE A 50-Suspension geschichtet. Nachdem sich der
Ionenaustauscher gesetzt hatte, wurde die Säule mit ca. 8 Sä-
lenvolumina (30 ml) $5 \times 10^{-3} \text{M}$ KPO_4 -Puffer (pH 7,2; Leitfähigkeit
1,07 mmho) unter einem hydrostatischen Druck von 20 cm Wasser-
säule gespült.

Die gemessene Absorption ($A_{280 \text{ nm}}$) des auslaufenden Puffers er-
reichte dabei einen konstanten Wert. Während des Spülens quoll
der Ionenaustauscher aufgrund der Abnahme der Ionenstärke auf
ein Volumen von ca. 5 ml.

Die dia- und ultrafiltrierten Proben (Normal-Milz: Vol. 4 ml;
Lymphom-Milz: Vol. 3,5 ml) wurden mittels einer Pasteur-Pipette
aufgetragen. Die anschließende Elution erfolgte bei einer kon-
stant gehaltenen Flußrate von 35 ml/Std. in Einzelfraktionen von
1,2 ml unter fortlaufender Registrierung der Extinktion des
Eluats bei $A_{254 \text{ nm}}$ und $A_{280 \text{ nm}}$.

Abb. 24 (A): Text siehe nächste Seite.

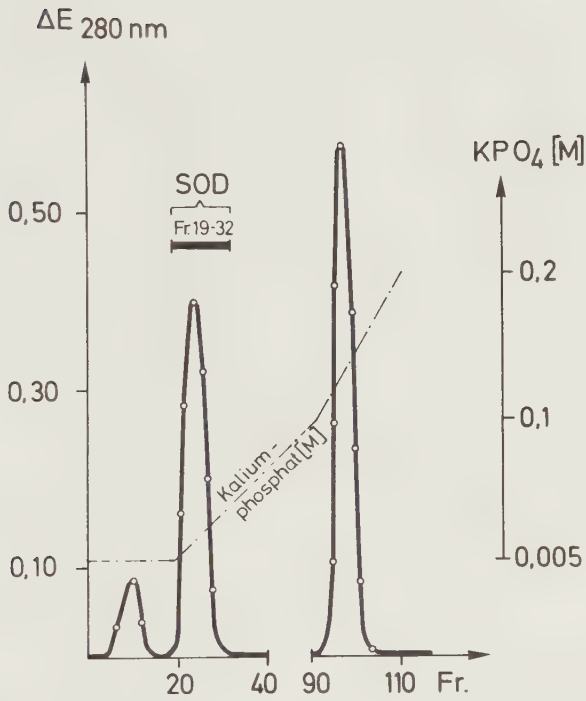


Abb. 24 (B)

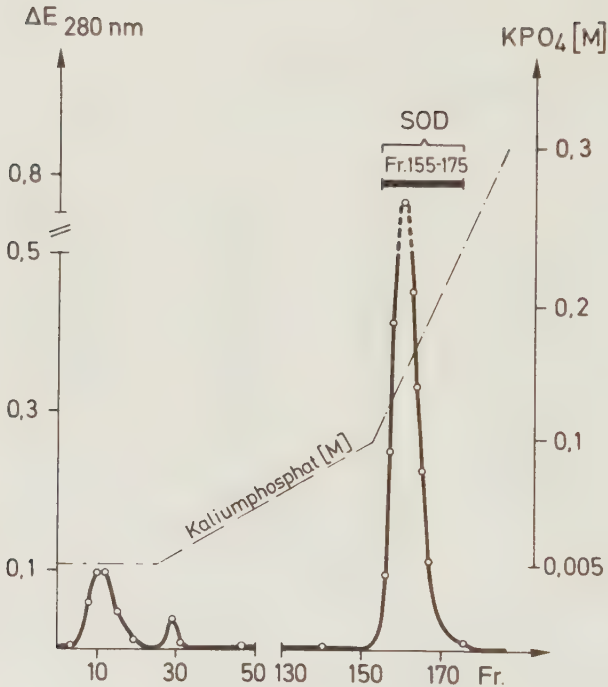


Abb. 24 (A) und (B): Elutionsdiagramme der mit 0,005 M KPO₄-Puffer (pH 7,2; Leitfähigkeit 1,07 mmho) äquilibrierten DEAE A 50-Säule von Normal-Milz (A) und Lymphom-Milz (B). Elution durch linearen KPO₄-Puffergradienten (0,005 M - 0,1 M, pH 7,2; anschließend: 0,1 M - 1,0 M, pH 7,2). Die Einzelfractionen wurden auf Proteingehalt ($A_{280\text{ nm}}$) untersucht. Die den Peaks entsprechenden Fractionen (Fr. 19 - 32 und 93 - 101 bei der Normal-Milz sowie Fr. 26 - 31 und 155 - 175 bei der Lymphom-Milz) wurden gepoolt und auf ihre Superoxiddismutase-Aktivität (SOD) untersucht (siehe Legende zu Abb. 20).

Zunächst wurde jeweils ein Ansteigen der Extinktion bei $A_{280\text{nm}}$ - bedingt durch die in der Probelösung verbliebenen Salze - beobachtet. Nach dem Absinken der Extinktion auf den Ausgangswert wurde ein linearer Puffer-Gradient von 0,005 M KPO_4 (pH 7,2; Leitfähigkeit 1,07 mmho) bis 0,1 M KPO_4 (pH 7,2; Leitfähigkeit 2,8 mmho) angelegt.

Dieser erste Gradient führte im Falle der Normal-Milz zu einem deutlichen Ansteigen der Extinktion des Eluats bei $A_{280\text{nm}}$, während bei der Lymphom-Milz kein derartiger Proteinpeak unter den angegebenen Bedingungen der Gradientenelution meßbar war.

Da in beiden Säulen eine Gelbfärbung in Form einer unscharfen Bande bestehen blieb, wurde die Elution mit einem zweiten linearen KPO_4 -Puffer-Gradienten von 0,1 M (pH 7,2; Leitfähigkeit 2,8 mmho) bis 1,0 M (pH 7,2; Leitfähigkeit 120 mmho) fortgesetzt. Unmittelbar nach dem Anlegen dieses Gradienten wurde jeweils ein scharfer Proteinpeak registriert.

Die den einzelnen Proteinpeaks entsprechenden Fraktionen (Normal-Milz: Fraktionen 19 - 32 und 93 - 101; Lymphom-Milz: Fraktionen 155 - 175) wurden vereinigt. Zusätzlich wurden die Fraktionen 26 - 31 der ersten Gradientenelution der Lymphom-Milz gepoolt, obwohl in diesem Bereich im Gegensatz zum steilen Proteinpeak der Normal-Milz (Fr. 19 - 32) nur ein schwacher Extinktionsanstieg bei $A_{280\text{ nm}}$ meßbar war.

Es schloß sich eine Ultrafiltration über eine Amicon YM 10 Membran an (jeweiliges Endvolumen 5,5 ml).

Die gepoolten und ultrafiltrierten Fraktionen 19 - 32 und 93 - 101 der Normal-Milz wurden mit 15 ml bzw. 30 ml 0,005 M KPO_4 -Puffer (pH 7,2; Leitfähigkeit 1,07 mmho) diafiltriert. Es resultierten jeweils 3,4 ml Diafiltrat.

Die gepoolten und ultrafiltrierten Fraktionen 26 - 31 und 155 - 175 der Lymphom-Milz wurden mit 15 ml bzw. 20 ml des gleichen Puffers diafiltriert. Das Endvolumen des Diafiltrats betrug jeweils 2,2 ml.

Anschließend wurde eine isoelektrische Fokussierung der diafiltrierten Fraktionen durchgeführt.

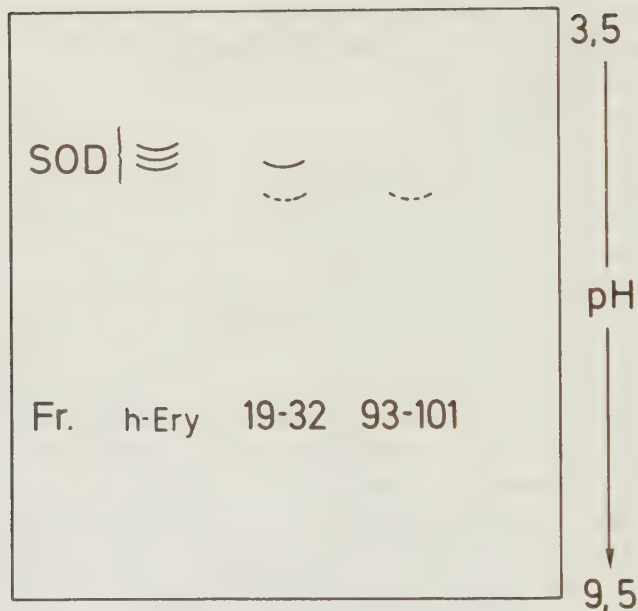


Abb. 25: Isoelektrische Fokussierung auf Polyacrylamidgel (PAG-plate, pH 3,5 - 9,5) der angegebenen Eluatfraktionen nach DEAE A 50-Chromatographie von Normal-Milz. Zum Vergleich wurde gereinigte Cu/Zn Superoxiddismutase aus Human-Erythrocyten (h-Ery) aufgetragen (siehe Legende zu Abb. 21).

Bei der Normal-Milz ließ sich nur in den Fraktionen 19 - 32 nach isoelektrischer Fokussierung Superoxiddismutase-Aktivität nachweisen.

Im gleichen Aktivitätstest bei der Lymphom-Milz war in den Fraktionen 155 - 175 eine schwache Superoxiddismutase-Aktivitätsbande erkennbar. Die Proteinfärbung zeigte keine Bande mehr, welche der Aktivitätsbande hätte zugeordnet werden können.

3.2.11. Reinigungstabellen

Die einzelnen Stufen der Präparation von Cu/Zn Superoxiddismutase aus Normal-Milz und Lymphom-Milz sind in den folgenden beiden Tabellen dargestellt. Da der Reinigungsschritt der Anionenaustauschchromatographie über DEAE A 50 (siehe 3.2.10.) nur mit einem Teil des Ultrafiltrats nach G 75-Gelfiltrationschromatographie durchgeführt wurde und zu keiner Ausbeute in präparativem Maßstab führte, ist er in den Tabellen nicht aufgeführt.

Bei der dargestellten Präparation der Cu/Zn Superoxiddismutase aus Normal-Milz des Menschen (Tabelle A) wurden 6 mg des gereinigten Enzyms mit einer spezifischen Aktivität von 3460 Units/mg Protein bei einer Gesamtausbeute von 2,4 % erhalten. Damit war eine 500-fache Anreicherung gegenüber dem Rohhomogenat-Überstand (spezifische Aktivität: 7,4 U/mg) zu erzielen. Das gepoolte Ultrafiltrat nach DEAE A 50-Chromatographie (Fr. 19 - 32) mit Superoxiddismutase-Aktivität (siehe 3.2.10. Abb. 24 (A) und Abb. 25) wies eine deutlich niedrigere spezifische Aktivität (620 U/mg) auf. Das deutet auf eine partielle Denaturierung des Enzyms unter den angegebenen Bedingungen dieses Reinigungsschrittes hin (siehe auch Diskussion 4.2.).

Im Vergleich wurden aus der Lymphom-Milz 8 mg der gereinigten Cu/Zn Superoxiddismutase gewonnen (Tabelle B). Auffallend war die deutlich niedrigere spezifische Aktivität (1280 Units/mg Protein) dieses Endprodukts, das sich dadurch bei einer Gesamtausbeute von 1,5 % nur um einen Faktor von 280 gegenüber dem Rohhomogenat-Überstand (spezifische Aktivität: 5,3 U/mg) anreichern ließ. Im gepoolten Ultrafiltrat nach DEAE A 50-Chromatographie (Fr. 155 - 175) mit Superoxiddismutase-Aktivität (siehe 3.2.10. Abb. 24 (B)) war aufgrund der niedrigen Proteinkonzentration keine Bestimmung der spezifischen Aktivität mehr möglich.

Tabelle A

Reinigung von Cu/Zn Superoxiddismutase aus Normal-Milz des Menschen.

Reinigungs- schritt	Vol. (ml)	Proteinkonz. (mg/ml)	Gesamt-Protein (g)	Aktivität (U/ml)	Gesamt-Aktiv. (U)	Spezif. Aktiv. (U/mg)	Ausbeute (%)	Reinigungs- faktor
Rohhomogenat- überstand	2100	55,3	116	407	854700	7,4	100	1
Äthanol- phase	800	10,2	8,2	559	447200	54,8	52,3	7,4
Dialysat	180	15,3	2,8	1475	265500	96,4	31,0	13,0
nach CM50- Chromato- graphie	11	4,4	0,049	1938	21320	436	2,5	58,9
nach G75- Chromato- graphie	8	0,7	0,006	2420	19360	3460	2,4	501

- 104 -

Tabelle B

Reinigung von Cu/Zn Superoxiddismutase aus Lymphon-Milz des Menschen.

Reinigungs- schritt	Vol. (ml)	Proteinkonz. (mg/ml)	Gesamt-Protein (g)	Aktivität (U/ml)	Gesamt-Aktiv. (U)	Spezif.Aktiv. (U/mg)	Ausbeute (%)	Reinigungs- faktor
Rohhomogenat- überstand	3350	47,0	157,5	251	840850	5,3	100	1
Äthanol- phase	1470	5,5	8,1	239	351300	43,4	41,8	8,2
Dialysat	200	10,5	2,1	1780	356000	170	42,3	32,1
nach CM50- Chromato- graphie	10	6,5	0,065	---	---	---	---	---
nach G75- Chromato- graphie	10	0,83	0,008	1060	10600	1280	1,5	278

3.2.12. Reinigungsgele

Eine Übersicht der schrittweisen Anreicherung der beiden Cu/Zn Superoxiddismutasen aus Normal-Milz und Lymphom-Milz des Menschen während des Trennungsganges bieten Abb. 26 und Abb. 27. Im Gegensatz zur Präparation aus Normal-Milz ist aus den genannten Gründen (siehe 3.2.11.) der DEAE A 50-Reinigungsschritt bei der Lymphom-Milz nicht dargestellt.

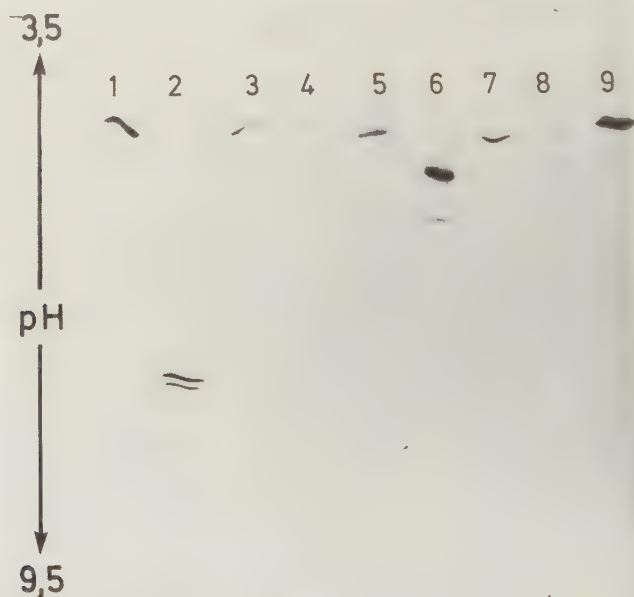


Abb. 26: Proteinauftrennung von Proben der einzelnen Reinigungsschritte von Superoxiddismutase aus **Normal-Milz** mittels isoelektrischer Fokussierung (PAG-plate, pH 3,5 - 9,5). Zusätzlich wurde gereinigte Cu/Zn Superoxiddismutase aus menschlichen Erythrocyten als Vergleichsprotein aufgetragen (36). Die je Probe eingesetzte Proteinmenge betrug 10 μ g (siehe Mat. und Methoden 2.3.6.1.).

1. Cu/Zn Superoxiddismutase aus menschlichen Erythrocyten
2. Überstand des Milzhomogenats
3. Nach Hämoglobinfällung
4. Äthanolphase
5. Nach Dialyse
6. Nach CM 50 und Ultrafiltration (Fr.20-63)
7. Nach G 75 und Ultrafiltration (Fr.90-119)
8. Nach DEAE A50 und Ultrafiltration (Fr.19-32)
9. Cu/Zn Superoxiddismutase aus menschlichen Erythrocyten

Normal-
Milz

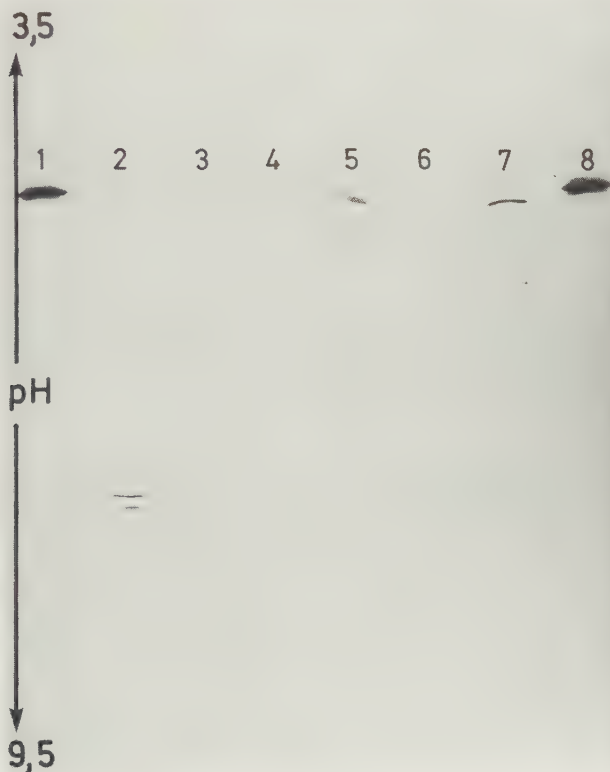


Abb. 27: Proteinauftrennung von Proben der einzelnen Reinigungsschritte von Cu/Zn Superoxiddismutase aus Lymphom-Milz mittels isoelektrischer Fokussierung (PAG-plate, pH 3,5 - 9,5). Zusätzlich wurde gereinigte Cu/Zn Superoxiddismutase aus menschlichen Erythrocyten als Vergleichsprotein aufgetragen (36).

Die je Probe eingesetzte Proteinmenge betrug 10 µg (siehe Mat. und Methoden 2.3.6.1.).

1. Cu/Zn Superoxiddismutase aus menschlichen Erythrocyten
2. Überstand des Milzhomogenats
3. Nach Hämoglobinfällung
4. Äthanolphase
5. Nach Dialyse
6. Nach CM 50 und Ultrafiltration (Fr.20-50)
7. Nach G 75 und Ultrafiltration (Fr.82-110)
8. Cu/Zn Superoxiddismutase aus menschlichen Erythrocyten

} Lymphom
Milz

3.3. Analytische Untersuchungen mit den gereinigten
Cu/Zn Superoxiddismutasen aus Normal-Milz und
Lymphom-Milz des Menschen

3.3.1. Auftrennung der Cu/Zn Superoxiddismutasen durch
isoelektrische Fokussierung

Zur Analyse der Isoenzymmuster wurden die gereinigten Superoxiddismutasen aus Normal-Milz und Lymphom-Milz nach G 75-Chromatographie (siehe 3.2.9.) auf Polyacrylamidgelen (PAG-plates) in einem hochauflösenden pH-Bereich von 4,0 - 6,5 isoelektrisch fokussiert. Die zusätzliche Auftragung des Enzyms aus Rinder-Erythrocyten (Diagnostic Data, Mountain View, USA) und aus menschlichen Erythrocyten (36) diente zum Vergleich der Isoenzyme.

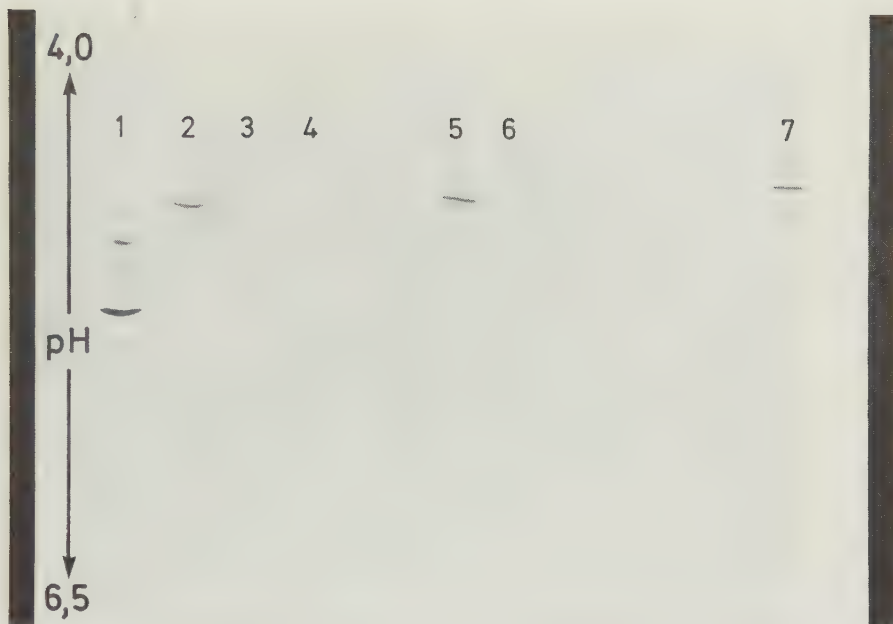


Abb. 28: Isoelektrische Fokussierung auf Polyacrylamidgel (PAG-plate, pH 4,0 - 6,5) der angegebenen gereinigten Cu/Zn Superoxiddismutasen (von links nach rechts):

1. Cu/Zn Superoxiddismutase aus Rinder-Erythrocyten (Diagnostic Data, Mountain View, USA)
2. Cu/Zn Superoxiddismutase aus Human-Erythrocyten (36)
3. Cu/Zn Superoxiddismutase aus Normal-Milz Ultrafiltrat nach G 75
4. Cu/Zn Superoxiddismutase aus Normal-Milz Ultrafiltrat nach DEAE A50
5. Cu/Zn Superoxiddismutase aus Human-Erythrocyten (36)
6. Cu/Zn Superoxiddismutase aus Lymphom-Milz Ultrafiltrat nach G 75
7. Cu/Zn Superoxiddismutase aus Human-Erythrocyten (36)

Aufgetragene Menge: 10 μ g Protein; Proteinfärbung (siehe Mat. und Methoden 2.3.6.1.).

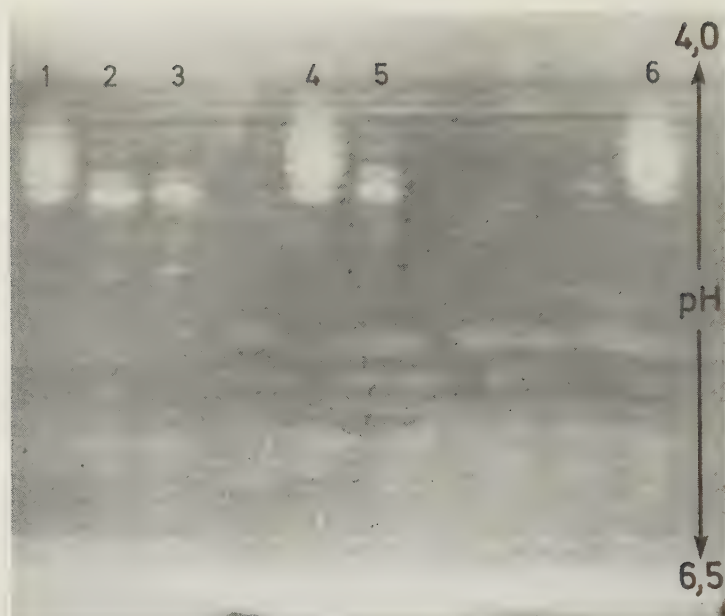


Abb. 29: Isoelektrische Fokussierung auf Polyacrylamidgel (PAG-plate, pH 4,0 - 6,5) der folgenden gereinigten Cu/Zn Superoxiddismutasen (von links nach rechts):

1. Cu/Zn Superoxiddismutase aus Human-Erythrocyten (36)
2. Cu/Zn Superoxiddismutase aus Normal-Milz
Ultrafiltrat nach G 75
3. Cu/Zn Superoxiddismutase aus Normal-Milz
Ultrafiltrat nach DEAE A50
4. Cu/Zn Superoxiddismutase aus Human-Erythrocyten (36)
5. Cu/Zn Superoxiddismutase aus Lymphom-Milz
Ultrafiltrat nach G 75
6. Cu/Zn Superoxiddismutase aus Human-Erythrocyten (36)

Aufgetragene Menge: 2 μ g Protein; Aktivitätsfärbung (siehe Mat. und Methoden 2.3.4.3.1.).

Aus der Abbildung 28 geht hervor, daß die isoelektrischen Punkte der Hauptisoenzyme von Rinder-Erythrocyten einen höheren pH-Wert als die der Human-Enzyme aufweisen. Die Cu/Zn Superoxiddismutase aus Human-Erythrocyten ließ sich in 5 Isoenzyme auftrennen; die Isoenzymbande aus Human-Erythrocyten mit dem am weitesten kathodisch gelegenen isoelektrischen Punkt entspricht in der Fokussierung dem isolierten Enzym aus menschlicher Normal-Milz. Bei der Lymphom-Milz stellt sich ein in bezug auf die Normal-Milz gleich wanderndes und zusätzlich ein zweites, anodischer gelegenes Isoenzym dar.

3.3.2. **Auftrennung der Cu/Zn Superoxiddismutase durch Polyacrylamid Diskgelelektrophorese**

Zur näheren Analyse der aus Normal-Milz nach DEAE A 50-Chromatographie gewonnenen Proteinfraction (siehe 3.2.10.) mit deutlich niedrigerer spezifischer Superoxiddismutase-Aktivität als das Endprodukt nach G 75-Chromatographie (siehe 3.2.11.) diente die Diskelektrophorese auf Polyacrylamidgelen (siehe Abb. 30).

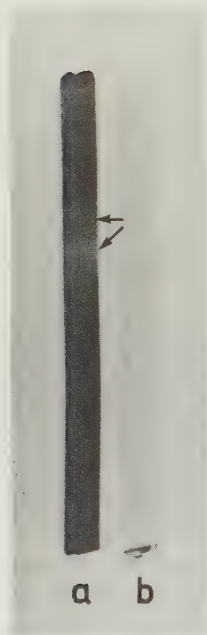


Abb. 30: Polyacrylamid Diskgelelektrophorese des Proteins nach DEAE A 50-Chromatographie aus Normal-Milz. Nach Durchführung der Elektrophorese (2 mA/Gel, 220 - 250 V) wurde auf dem Gel a (aufgetragene Proteinmenge: 1 μ g) Superoxiddismutase-Aktivität mittels Hemmung der photochemischen Reduktion von Nitrotetrazoliumblau (NBT) nachgewiesen. Dazu wurde dieses Gel zunächst für 20 min in $2,45 \times 10^{-3}$ M NBT, daraufhin 15 min lang in einer Lösung mit 0,028 M Tetramethyläthylendiamin (TEMED), $2,8 \times 10^{-3}$ M Riboflavin, 0,036 M KPO_4 -Puffer, pH 7,8, inkubiert. Nach 15-minütiger UV-Bestrahlung ließ sich Superoxiddismutase-Aktivität in Form von achromatischen Banden auf dem Gel lokalisieren. Das Gel b wurde im gleichen Ansatz (aufgetragene Proteinmenge: 5 μ g) einer Proteinfärbung mit 0,5 % (w/v) Amidoschwarz in 7 % (v/v) Essigsäure unterzogen. Die Entfärbung erfolgte mit 7 % Essigsäure.

Unter Berücksichtigung der angegebenen Reinigungsdaten für die Präparation der Cu/Zn Superoxiddismutase aus Normal-Milz des Menschen (siehe 3.2.11.) ergibt sich für die nach DEAE A 50-Chromatographie eluierbare Superoxiddismutase-aktive Proteinfraction eine Auftrennung in zwei Proteinbanden, wobei der oberen der beiden Banden zwei Aktivitätsbanden zugeordnet werden können (siehe Abb. 30). Die gefundene erniedrigte spezifische Aktivität (620 U/mg) gegenüber dem gereinigten Endprodukt nach G 75-Chromatographie (3460 U/mg) ist mit diesem elektrophoretischen Verhalten korrelierbar.

Eine entsprechende Untersuchung mit der Proteinfraction nach DEAE A 50-Chromatographie aus Lymphom-Milz war aufgrund der niedrigen Proteinkonzentration nicht möglich.

3.3.3. Auftrennung der Cu/Zn Superoxiddismutase durch zweidimensionale Polyacrylamid Gelelektrophorese

Mit der zweidimensionalen Polyacrylamid Gelelektrophorese (siehe Mat. und Methoden 2.3.6.3.) wurden aufgrund der Kombination des Trenneffektes der isoelektrischen Fokussierung (1.Dimension) und der Polyacrylamidgradienten-Elektrophorese (2.Dimension) die Proteinmuster der Enzympräparationen aus Normal-Milz und Lymphom-Milz des Menschen untersucht. Durch Auftragen von Eichproteinen mit bekannten Molekulargewichten konnte das Molekulargewicht dieser Enzymproben unter den angegebenen Bedingungen näherungsweise bestimmt werden.

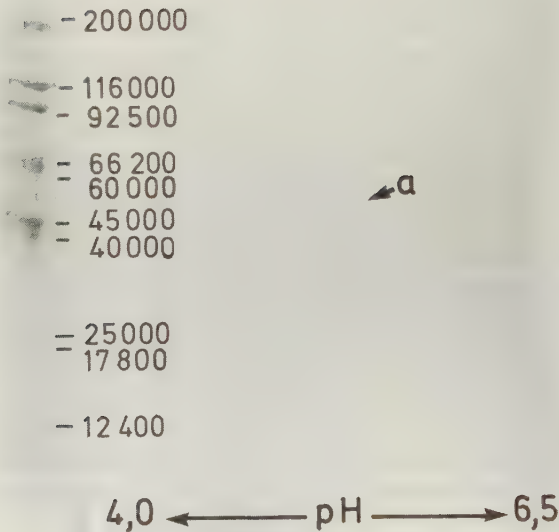


Abb. 31: Zweidimensionale Gelelektrophorese der Enzympräparation aus Normal-Milz des Menschen. Zunächst wurde eine isoelektrische Fokussierung (1.Dimension, siehe Mat. und Methoden 2.3.6.3.1.ff.) im pH-Bereich von 4,0 - 6,5 durchgeführt: je Rundgel wurden 10 µg Protein in Pufferlösung (0,005 M KPO₄-Puffer, pH 7,2) aufgetragen.

Elektrophoresebedingungen: 5 mA bei 200 V über 15 1/2 Std.

In der 2. Dimension (Polyacrylamid Gradientengel, siehe Mat. und Methoden 2.3.6.3.5.ff.) wurden das Rundgel sowie eine Eichproteinklösung (5 µl) mit folgenden 10 Eichproteinen aufgetragen (Molekulargewicht in Dalton):

- | | |
|----------------------------|--------------------------------|
| 1) Myosin (200000) | 2) beta-Galactosidase (116000) |
| 3) Phosphorylase B (92500) | 4) Rinder-Serumalbumin (66200) |
| 5) Katalase (60000) | 6) Ovalbumin (45000) |
| 7) Aldolase (40000) | 8) Chymotrypsinogen (25000) |
| 9) Myoglobin (17800) | 10) Cytochrom c (12400) |

Elektrophoresebedingungen: 30 - 40 mA bei 250 V über 4 3/4 Std.
Färbung mit 0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau-Lösung.

spot "a": 51000 Dalton bei pH 5,1

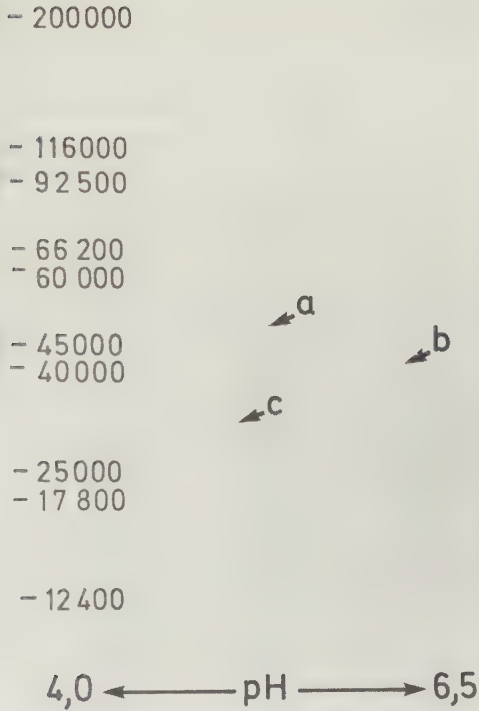


Abb. 32: Zweidimensionale Gelelektrophorese der Enzympräparation aus Lymphom-Milz (Angaben zur Methode siehe Abb. 31).

spot "a" : 51000 Dalton bei pH 5,1
spot "b" : 39000 Dalton bei pH 5,9
spot "c" : 30500 Dalton bei pH 4,6

Das aus Normal-Milz isolierte Enzym zeigt auf dem Gel einen spot "a" bei einem Molekulargewicht von ca. 51000 Dalton und einem isoelektrischen Punkt von etwa pH 5,1.

Im Vergleich dazu weist das Proteinmuster der Cu/Zn Superoxiddismutase aus Lymphom-Milz zwei sich relativ intensiv darstellende spots auf, von denen der eine ("c") einem Molekulargewicht von ca. 30500 Dalton und einem isoelektrischen Punkt von etwa pH 4,6 entspricht. Der andere (spot "b") ist einem höheren Molekulargewicht (39000 Dalton) und einem isoelektrischen Punkt mit höherem pH (ca. 5,9) zuzuordnen. Der dritte spot ("a") mit einem Molekulargewicht von ca. 51000 Dalton und einem isoelektrischen Punkt von etwa pH 5,1 tritt schwach in Erscheinung und entspricht dem Protein, das bei der Normal-Milz gefunden wurde.

3.3.4. Molekulargewicht

Zur Bestimmung der Molekulargewichte der Untereinheiten der isolierten Cu/Zn Superoxiddismutasen aus Normal-Milz sowie aus Lymphom-Milz wurde eine Polyacrylamid Diskgelelektrophorese in Anwesenheit von 1 % Natriumdodecylsulfat (SDS) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte über Eichgeraden (Auftragung des Molekulargewichtes gegen die Mobilität der Proteine im semilogarithmischen Maßstab), für deren Aufstellung die Mobilität von 5 Eichproteinen mit bekanntem Molekulargewicht berechnet wurde und die für jeden Elektrophoreselauf jeweils neu ermittelt wurden (nähere Angaben zur Technik siehe Material und Methoden, 2.3.6.5.).

Gel A: Präparation von Cu/Zn Superoxiddismutase aus
Normal-Milz des Menschen (Ultrafiltrat nach G 75)

Gel B: Präparation von Cu/Zn Superoxiddismutase aus
Lymphom-Milz des Menschen (Ultrafiltrat nach G 75)

Gel C: Präparation von Cu/Zn Superoxiddismutase aus
Normal-Milz des Menschen (Ultrafiltrat nach DEAE A 50)

Pro Gel wurden 15 μg Protein aus der Enzymlösung aufgetragen. Gel A und Gel B wurden zusätzlich mit 5 Eichproteinen (15 μg Protein je Eichprotein) beschickt (siehe Legende zu Abb. 33).

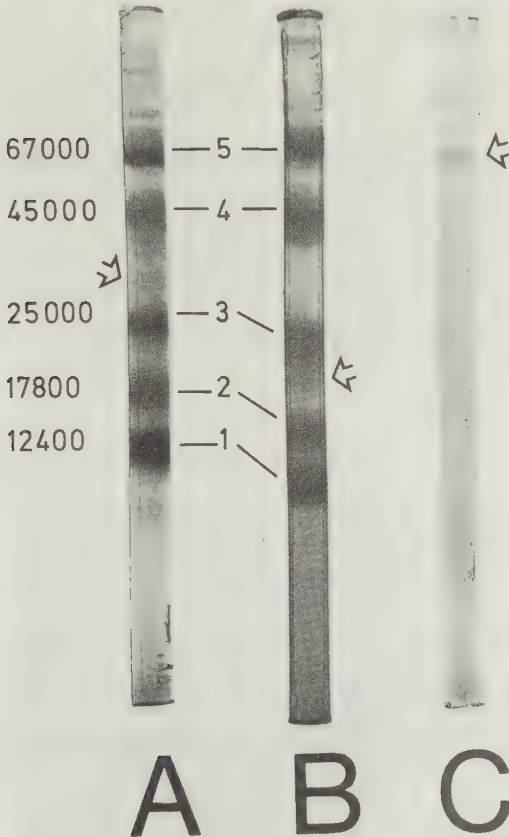


Abb. 33: SDS-Polyacrylamid Diskgelelektrophorese zur Molekulargewichtsbestimmung der Untereinheiten der aus Normal- und Lymphom-Milz isolierten Cu/Zn Superoxiddismutasen.

Gel A: Normal-Milz (Ultrafiltrat nach G 75) mit 5 Eichproteinen

Gel B: Lymphom-Milz (Ultrafiltrat nach G 75) mit 5 Eichproteinen

Gel C: Normal-Milz (Ultrafiltrat nach DEAE A 50)

Folgende 5 Eichproteine (Serva Protein-Testmischung 9) wurden auf Gel A und auf Gel C zusätzlich aufgetragen (Molekulargewicht in Dalton):

- 1) Cytochrom c (12400)
- 2) Myoglobin (17800)
- 3) Chymotrypsinogen (25000)
- 4) Ovalbumin (45000)
- 5) Rinder-Serumalbumin (67000)

Die Herstellung der Gele, die Durchführung der Elektrophorese sowie die Auswertung erfolgten nach der von Weber und Osborn beschriebenen Methode (112).

Bei den Gelen A und C wurde die Elektrophorese unter nicht reduzierenden Bedingungen (Inkubation der Probe ohne Mercaptoäthanol bei 20 °C über 2 Std.) durchgeführt, bei Gel B unter reduzierenden Bedingungen (Inkubation der Probe in 0,1 % beta-Mercaptoäthanol bei 56 °C über 2 Std.). Zur Färbung der Gele wurde 0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue in 20 % (w/v) Trichloressigsäure in wässriger Lösung verwendet. Zur Entfärbung diente 7 % Essigsäure.

Weitere Angaben zur Methode und Auswertung der Elektrophorese siehe Mat. und Methoden 2.3.6.5.

In den Gelen A und B treten die 5 Eichproteine (Abb. 33: 1-5) als intensiv gefärbte Banden in Erscheinung. Gel A zeigt eine Proteinbande, welche zwischen dem 3. und 4. Eichprotein wandert (siehe Pfeil).

Gel B weist außer den Eichprotein-Banden eine Bande mit einer im Vergleich zum 3. Eichprotein etwas höheren elektrophoretischen Mobilität auf (siehe Pfeil).

In Gel C stellt sich eine einzige, elektrophoretisch gering mobile Bande dar.

Durch Auswertung über Eichgeraden (siehe Abb. 18) ließen sich für die zusätzlich zu den Eichproteinen in Erscheinung tretenden Banden folgende Molekulargewichte berechnen:

Cu/Zn Superoxiddismutase aus Normal-Milz:

- | | |
|-------------------------------|--------------|
| a) Ultrafiltrat nach G 75 | 33000 Dalton |
| (nicht reduz. Bed.) | |
| b) Ultrafiltrat nach DEAE A50 | 60000 Dalton |
| (nicht reduz. Bed.) | |
| c) *Ultrafiltrat nach G 75 | 17000 Dalton |
| (reduzierende Bed.) | |

Cu/Zn Superoxiddismutase aus Lymphom-Milz:

Ultrafiltrat nach G 75	18000 Dalton
(reduzierende Bed.)	

(*auf der Abbildung 33 nicht dargestellt)

3.3.5. Metallgehaltsanalyse

Der Kupfer- und Zinkgehalt der Enzympräparationen aus Normal-Milz und Lymphom-Milz des Menschen wurde atomabsorptionsspektrophotometrisch bestimmt (siehe Mat. und Methoden 2.3.6.4.). Die Proteinbestimmung in den Enzymlösungen erfolgte dabei über Absorptionsmessung bei $A_{265\text{nm}}$. Die bei dieser Wellenlänge gegen den Lösungspuffer gemessenen Extinktionswerte dienten mit dem von Stansell und Deutsch (104) angegebenen molaren Absorptionskoeffizienten ($\epsilon_{265\text{ nm}} = 18700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) zur Errechnung der Molarität der Cu/Zn Superoxiddismutase (siehe Mat. und Methoden 2.3.1.3.).

Cu/Zn Superoxiddismutase-Enzymlösungen

	Normal-Milz nach G 75	Lymphom-Milz nach G 75
gemessene Extink- tion ($E_{265 \text{ nm}}$)	0,187	0,237
Molekulargewicht der Untereinheiten (Dalton)	17000	18000
$\epsilon_{265 \text{ nm}}$ ($M^{-1}cm^{-1}$)	18700	18700
Molarität der Cu/Zn Su- peroxiddismutase (mol/l),	$1,00 \cdot 10^{-5}$	$1,27 \cdot 10^{-5}$
gemessene Konzentration der Metalle (Mittelwerte aus 5 Messungen):		
Cu ($\mu g/100 \text{ ml}$)	114	132
Zn ($\mu g/100 \text{ ml}$)	115	135

Daraus errechnet sich:

Cu (mol/l)	$1,80 \cdot 10^{-5}$	$2,08 \cdot 10^{-5}$
Zn (mol/l)	$1,76 \cdot 10^{-5}$	$2,06 \cdot 10^{-5}$

Den Berechnungen wurde für Kupfer ein Molekulargewicht von 63,5 Dalton und für Zink ein Molekulargewicht von 65,4 Dalton zugrundegelegt.

Aus den gemessenen Kupfer- und Zinkwerten ergaben sich so für die

Normal-Milz nach G 75 $0,9 \cdot (\pm 0,15)$ g Atom Kupfer und
 $0,9 (\pm 0,15)$ g Atom Zink pro
 Untereinheit Super-
 oxiddismutase

Lymphom-Milz nach G 75 $0,8 (\pm 0,1)$ g Atom Kupfer und
 $0,8 (\pm 0,15)$ g Atom Zink pro
 Untereinheit Super-
 oxiddismutase

Die ermittelten Kupfer- und Zinkwerte des Enzyms aus Lymphom-Milz nach G 75-Chromatographie liegen im Bereich der für das Enzym aus Normal-Milz bestimmten und der in der Literatur für Cu/Zn Superoxiddismutasen aus menschlichem Gewebe angegebenen Werte (19, 104).

Auf die besondere Bedeutung der Dissoziation in Untereinheiten und den Einfluß der Pufferzusammensetzung bei der G 75-Chromatographie wird in 3.3.6. und 4.2. eingegangen.

3.3.6. Pulsradiolyse

Zur Untersuchung der katalytischen Aktivität der gereinigten Superoxiddismutasen aus Normal-Milz und aus Lymphom-Milz diente die Pulsradiolyse als direktes Nachweisverfahren (siehe Mat. und Methoden 2.3.5.1.).

Es wurden jeweils vier Einzelmessungen bei einer bestimmten Konzentration des Enzyms durchgeführt, aus denen die Mittelwerte der Geschwindigkeitskonstanten und deren Standardabweichungen bestimmt wurden.

Die Messung der Reaktionsgeschwindigkeiten erfolgte in sauerstoffgesättigten und formiathaltigen Lösungen (0,1 M Formiat) bei pH 7,3. Die pro Puls abgegebene Dosis von 2,5 krad führte zu einer durchschnittlichen Anfangskonzentration der $\cdot\text{O}_2^-$ -Radikale von $1,6 \times 10^{-5}$ M.

Da die zu pulsradiolytischen Untersuchungen eingesetzte Cu/Zn Superoxiddismutase aus Lymphom-Milz in Puffer gelöst war, welcher 10^{-5} M EDTA und 0,1 % beta-Mercaptoäthanol enthielt, wurden Vorversuche zur Klärung der Frage durchgeführt, inwiefern diese Pufferbestandteile bei der Ermittlung der Pulsradiolysedaten störend Einfluß nehmen.

Untersuchungen mit Puffern, in denen die oben genannten Bestandteile in ihrer Konzentration derjenigen im Enzym-Probenansatz entsprachen, zeigten, daß die Reaktionskonstante der Spontandismutation von Superoxidradikalen ($K = 6,3 \pm 0,14 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$) geringfügig gegenüber dem Puffer-freien System

($K = 1,1 \pm 0,1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$) verlangsamt war. Untersuchungen mit Puffer und Cu/Zn Superoxiddismutase aus Rinder-Erythrocyten (Diagnostic Data, Mountain View, USA) ergaben, daß der Puffer keinen Einfluß auf die Aktivität dieses Enzyms hat. Eine Pufferbedingte Reduzierung der Superoxiddismutase-Aktivität kann nur in Enzymlösungen erwartet werden, in denen Kupfer unspezifisch oder außergewöhnlich locker an das Protein gebunden ist.

Die Messung der Reaktionsgeschwindigkeit einer mit H_2O bidest. 1:10 verdünnten Probe der Enzympräparation aus Lymphom-Milz nach G 75-Chromatographie (EDTA-Konzentration $1 \times 10^{-6}\text{M}$) ergab einen Wert von $1,56 \pm 0,45 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$. Um zu untersuchen, in welchem Maße das Enzym aus Lymphom-Milz in der Lage war, eventuell verlorenes Kupfer wieder zurückzubinden, wurde zu der 1:20 verdünnten Enzymlösung aus Lymphom-Milz ($1,5 \times 10^{-6}\text{M}$) freies Kupfer im Überschuß in Form einer $3,4 \times 10^{-6}\text{M}$ Kupfersulfatlösung zugegeben. Als Reaktionsgeschwindigkeitskonstante wurde hier ein Wert von $1,8 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ ermittelt. Nach Abfangen des zugesetzten freien Kupfers durch EDTA ($4,3 \times 10^{-6}\text{M}$), welches mit

Kupfer einen Superoxiddismutase-inaktiven Komplex bildet, sank die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante des Enzyms geringfügig auf einen Wert von $1,2 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ ab. Im Vergleich zur Geschwindigkeitskonstante vor Kupferzusatz mißt man einen um etwa eine Zehnerpotenz höheren Wert, der jedoch immer noch um den Faktor 10 unter dem Wert für eine Cu/Zn Superoxiddismutase aus normalen menschlichen Erythrocyten bzw. um den Faktor 20 unter der Reaktionsgeschwindigkeitskonstante des Enzyms aus normaler menschlicher Milz (s. unten) liegt.

Cu/Zn Superoxiddismutase aus normaler Menschenmilz, deren Geschwindigkeitskonstante bei einer Enzymkonzentration von $7,3 \times 10^{-7}\text{M}$ und einer EDTA-Konzentration von $4,3 \times 10^{-6}\text{M}$, wie sie auch bei der Untersuchung des Enzyms aus Lymphom-Milz vorlag, mit $2,17 \pm 0,15 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ gemessen wurde, zeigte unter diesen Bedingungen einen normalen Wert. Eventuell die Messung beeinflussendes freies Kupfer, welches in der Lage ist, mit Formiat Superoxiddismutase-aktive Komplexe zu bilden (59), wurde durch den Zusatz von EDTA ($4,3 \times 10^{-6}\text{M}$) in Form eines inaktiven Komplexes gebunden. Auffallend war, daß die Geschwindigkeitskonstante des Enzyms aus normaler Menschenmilz bei Verdoppelung der EDTA-Konzentration auf $1,0 \times 10^{-5}\text{M}$ um fast eine Zehnerpotenz auf einen Wert von $3,03 \pm 0,71 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ absank. Eine EDTA-Konzentration von $1,0 \times 10^{-5}\text{M}$ beeinflußt die Geschwindigkeitskonstante einer Cu/Zn Superoxiddismutase aus menschlichen Erythrocyten nicht (58).

Die Ergebnisse der Pulsradiolyse sind tabellarisch zusammengestellt.

	EDTA-Konzentration (M)	Probenkonzentration (M)	Reaktionsgeschwindigkeitskonstante K_2 ($M^{-1}sec^{-1}$)
Normal-Milz nach DEAE	$4,3 \times 10^{-6}$	$7,3 \times 10^{-7}$	$2,17 \pm 0,15 \times 10^9$
Lymphom-Milz nach G 75	$4,3 \times 10^{-6}$	$1,5 \times 10^{-6}$	$1,2 \pm 0,1 \times 10^8$
Human-Erythrocyten nach DEAE A 50	$4,3 \times 10^{-6}$	$6,6 \times 10^{-7}$	$1,18 \pm 0,13 \times 10^9$

3.3.7. Immunologische Untersuchungen mit gereinigter Cu/Zn Superoxiddismutase aus Human-Milzgewebe

Als ein zusätzliches Reinheitskriterium zur Beurteilung der Cu/Zn Superoxiddismutasen aus Normal-Milz und Lymphom-Milz des Menschen wurden immunologische Verfahren angewandt, die als sensible Methoden sowohl zur Analyse von Fremdproteinverunreinigungen als auch zum Nachweis von Unterschieden der antigenen strukturellen Eigenschaften vergleichbarer Proteine gelten. Diese Untersuchungen wurden im Labor von Herrn Prof. Dr. Lamerz, Medizinische Klinik II im Klinikum Großhadern der Universität München, durchgeführt.

Zur Gewinnung von polyklonalen monospezifischen Antikörpern gegen Cu/Zn Superoxiddismutase aus Human-Erythrocyten (36) wurden

einem weiblichen New Zealand-Kaninchen nach einer modifizierten Methode von Hijmans et al. (41 a) 2 x 0,5 mg Antigen (Cu/Zn Superoxiddismutase aus Human-Erythrocyten) in 0,5 ml physiologischer Kochsalzlösung mit komplettem bzw. inkomplettem Freund'schem Adjuvans subcutan und nach drei Wochen weitere 0,5 mg Antigen als Aluminiumpräzipitat in sechs Einzeldosen über drei Wochen intravenös appliziert. Die Untersuchung des Antiserums erfolgte mittels Ouchterlony-Immundiffusionstest auf Objektträgern (Difco-Agar 2 %). In demselben Testansatz (s. Abb. 34) sollte ein der Species-Verschiedenheit entsprechender struktureller Unterschied der Antigendeterminanten zwischen Cu/Zn Superoxiddismutase aus Rindergewebe und vergleichbarer Cu/Zn Superoxiddismutase aus menschlichem Gewebe aufgezeigt werden.

Dazu wurde in das zentrale Reservoir einer Sechsfach-Rosette das Kaninchen-Antiserum gefüllt und im Ansatz gegen Cu/Zn Superoxiddismutase aus Human-Erythrocyten, Cu/Zn Superoxiddismutase aus Normal-Milz des Menschen, Cu/Zn Superoxiddismutase aus Normal-Milz des Rindes (36), Cu/Zn Superoxiddismutase aus Rinder-Erythrocyten (Fa. Diagn. Data, USA) sowie gegen Kochsalzlösung und menschliches Normalserum eingesetzt.

Wie Abb. 34 zeigt, entwickelte sich eine starke Präzipitatlinie zwischen dem Antiserum und Cu/Zn Superoxiddismutase aus Human-Erythrocyten, welche direkt und ohne Überkreuzung in eine ebenfalls deutliche Präzipitatlinie gegen Cu/Zn Superoxiddismutase aus menschlicher Normal-Milz übergeht. Dagegen erfolgte keine Reaktion zwischen dem Antiserum und den beiden Präparationen von Cu/Zn Superoxiddismutase aus Rindergewebe (normale Rindermilz und Rinder-Erythrocyten). Ebenso blieb die Bildung eines Präzipitats zwischen Antiserum und Kochsalzlösung bzw. Normalserum aus.

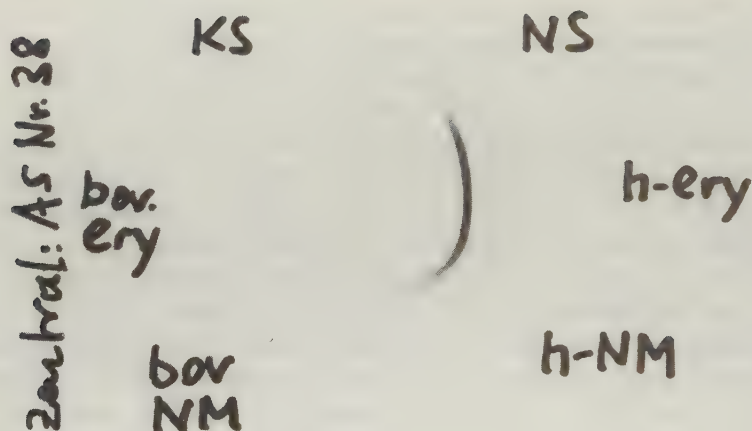


Abb. 34: Ouchterlony-Immundiffusionstest zum Nachweis eines strukturellen Unterschieds der Antigendeterminanten zwischen Cu/Zn Superoxiddismutase aus Rindergewebe und vergleichbarer Cu/Zn Superoxiddismutase aus menschlichem Gewebe.

Von einem gegen Cu/Zn Superoxiddismutase aus Human-Erythrocyten immunisierten Kaninchen wurden 15 μ l Serum in das zentrale Stanzloch einer Objektträger-Agarplatte gefüllt. In die konzentrisch um das zentrale Reservoir angeordneten Reservoirs wurden je 15 μ l Lösung von Cu/Zn Superoxiddismutase aus Human-Erythrocyten (h-ery), Cu/Zn SOD aus menschlicher Normal-Milz (h-NM), Cu/Zn SOD aus normaler Rindermilz (bov.NM), Cu/Zn SOD aus Rinder-Erythrocyten (Fa. Diagn. Data, USA) (bov. ery) sowie Kochsalzlösung (KS) und Normalserum (NS) pipettiert.

Nach 36-stündiger Beobachtungsdauer und 24-stündigem Waschen mit physiologischer Kochsalzlösung wurden die Präzipitate mit Azocarmin-Lösung (in Eisessig und Methanol im Verhältnis 10:90 v/v) gefärbt.

Ein weiterer auf einem Objektträger (Difco-Agar 2 %) durchgeführter Ouchterlony-Immundiffusionstest sollte zur Beantwortung der Frage führen, ob die aus Lymphom-Milz des Menschen isolierte Cu/Zn Superoxiddismutase trotz ihrer im Vergleich zu Cu/Zn Superoxiddismutase aus Normal-Milz des Menschen deutlich niedrigeren spezifischen Aktivität (s. 3.2.11.) species-identische antigene strukturelle Eigenschaften aufweist.

Dazu wurde in das zentrale Stanzloch einer Sechsfach-Rosette der aus Kaninchen gewonnene polyklonale monospezifische Antikörper gegen Cu/Zn Superoxiddismutase aus Human-Erythrocyten gegeben und im Ansatz gegen Cu/Zn Superoxiddismutase aus Human-Erythrocyten (36), Cu/Zn Superoxiddismutase aus menschlicher Normal-Milz, Cu/Zn Superoxiddismutase aus menschlicher Lymphom-Milz, Cu/Zn Superoxiddismutase aus Rinder-Erythrocyten (Fa. Diagn. Data, USA) sowie gegen Kochsalzlösung und menschliches Normalserum eingesetzt.

Es bildete sich eine deutliche durchgehende Präzipitatlinie (s. Abb. 35) zwischen dem Antiserum einerseits und den Cu/Zn Superoxiddismutasen aus Human-Erythrocyten, aus menschlicher Normal-Milz und aus menschlicher Lymphom-Milz andererseits. Die geringere Intensität der Präzipitatlinie gegen Cu/Zn Superoxiddismutase aus Lymphom-Milz muß auf die niedrigere Konzentration des eingesetzten Proteins zurückgeführt werden.

Der Test läßt erkennen, daß das aus Lymphom-Milz isolierte Enzym im Vergleich zu den beiden anderen untersuchten Cu/Zn Superoxiddismutasen aus menschlichem Gewebe identische antigene strukturelle Eigenschaften besitzt.

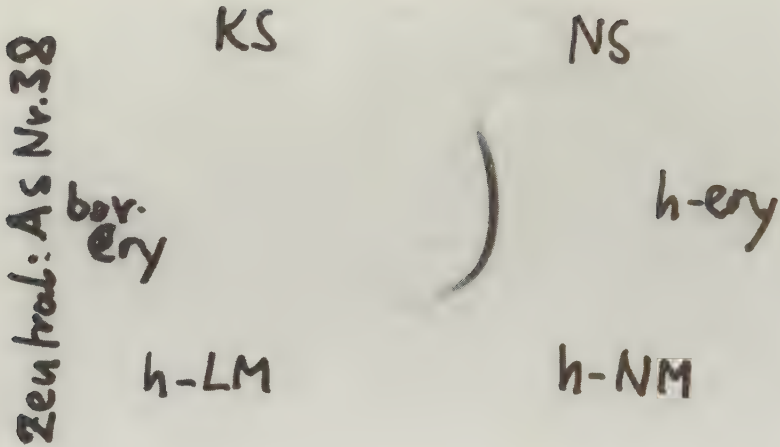


Abb. 35: Ouchterlony-Immundiffusionstest zum Nachweis species-identischer antigener struktureller Eigenschaften von Cu/Zn Superoxiddismutase aus Lymphom-Milz des Menschen im Vergleich zu den aus Normal-Milz und Erythrocyten des Menschen gewonnenen Enzymen.

Das in das zentrale Stanzloch eingefüllte Serum (15 μ l) eines gegen Cu/Zn Superoxiddismutase aus Human-Erythrocyten immunisierten Kaninchens diffundierte gegen Cu/Zn Superoxiddismutase aus Human-Erythrocyten (h-ery), Cu/Zn SOD aus Normal-Milz (h-NM) des Menschen, Cu/Zn SOD aus Lymphom-Milz des Menschen (h-LM), Cu/Zn SOD aus Rinder-Erythrocyten (Fa. Diagn. Data, USA) (bov. ery) sowie gegen Kochsalzlösung (KS) und Normalserum (NS). Näheres zur Technik siehe Abb. 34, Seite 126.

4. DISKUSSION

Die quantitative Bestimmung der Superoxiddismutase-Aktivität in Tumorgewebe und deren Vergleich mit Normalgewebe ist wegen der erwähnten Sauerstofftoxizität und der aufgezeigten Bedeutung der Superoxidradikale für die Tumorzellbiologie von großem Interesse. Ein derartiger Vergleich der Superoxiddismutase-Aktivität wurde im Gegensatz zu Untersuchungen in Gewebsrohhomogenaten erstmals mit gereinigter Cu/Zn Superoxiddismutase aus normaler Rindermilz und menschlicher Lymphom-Milz unternommen (43).

Im folgenden werden die Ergebnisse der Isolierung von Cu/Zn Superoxiddismutase aus menschlicher Normal-Milz und Lymphom-Milz vergleichend diskutiert. Dabei soll insbesondere berücksichtigt werden, inwieweit die Ergebnisse der Isolierung aus Lymphom-Milz (43) reproduzierbar sind und andererseits die erstmalige Reinigung der Cu/Zn Superoxiddismutase aus normalem Milzgewebe des Menschen neue Aspekte liefern kann.

Eine sorgfältige Analyse der Ergebnisse soll die Frage klären, ob es Hinweise auf einen strukturellen oder funktionellen Unterschied zwischen der Cu/Zn Superoxiddismutase aus Human-Milz und der bekannten Cu/Zn Superoxiddismutase aus Human-Erythrocyten gibt.

Im Gegensatz zum heterologen Rind/Mensch-System ist durch die hier erfolgte Isolierung der Cu/Zn Superoxiddismutase aus Normal- und Tumormilzgewebe ein direkter Vergleich speciesidentischer Enzyme möglich.

Die Diskussion der Zelluntersuchungen soll diesen Fragen vorausgehen und auf deren Aussagekraft im Vergleich zu Untersuchungen an gereinigten Enzymen hinweisen.

4.1. Superoxiddismutase-Gesamtaktivität in Leukocyten
gesunder Spender und an Lymphom erkrankter Patienten

In verschiedenen Publikationen der letzten Jahre wurde eine quantitative Verminderung der Superoxiddismutase-Gesamtaktivität (16, 82, 87, 96, 117), eine Verminderung der Cu/Zn Superoxiddismutase-Aktivität (66, 81, 87, 117) sowie eine Verminderung bzw. ein Fehlen der Mn Superoxiddismutase-Aktivität (24, 43, 45, 81, 87, 96, 118) in Tumorzellen festgestellt (siehe Einleitung 1.4.). Die methodischen Schwierigkeiten derartiger Untersuchungen sollen auf der Basis der dargestellten Ergebnisse und Meßwerte der Superoxiddismutase-Gesamtaktivität in menschlichen Blutzellen erläutert werden.

Trotz der angegebenen niedrigeren Superoxiddismutase-Aktivität in Erythrocyten (51) gegenüber polymorphkernigen Granulocyten und Lymphocyten gesunder Spender ist eine quantitative Abtrennung der Erythrocyten im Ausgangsmaterial (Venenblut) für den Vergleich der Superoxiddismutase-Aktivität in diesen leukocytierten Zellpopulationen erforderlich. Sowohl das Trennverfahren für Lymphocyten über einen Ficoll-Gradienten (15) als auch die beschriebene Methode der Granulocytenanreicherung durch anschließende Dextran sedimentation (55, 100) waren im Hinblick auf eine "Verunreinigung" durch Resterythrocyten unbefriedigend. Das Verfahren der Trennung über einen vorgefertigten sigmoiden Dichtegradienten ist trotz des zeitlichen und technischen Aufwands vorzuziehen, da einerseits erythrocytenfreie Zellfraktionen gewonnen werden und andererseits bei unbeeinträchtigter Vitalität die Ausbeute der Zellen nicht verringert wird.

Der mittels Cytochrom c -Reduktionshemmtest (siehe Mat. und Methoden 2.3.4.1.) gefundene Mittelwert der Superoxiddismutase-Gesamtaktivität in Lymphocyten gesunder Spender stimmt, auf Protein oder Zellzahl bezogen ($7,6 \pm 1,6$ SD Units/mg bzw. $4,6 \pm 1,28$ SD Units/ 10^7 Zellen), mit den Angaben von Kobayashi et al. (51) überein. Die mit dem Nitritformationshemmtest zusätzlich durchgeführte Bestimmung der Superoxiddismutase-Akti-

vität in den gereinigten Zellfraktionen ergibt erwartungsgemäß aufgrund der größeren Empfindlichkeit des Testverfahrens (55) um den Faktor 1,3 bis 1,9 höhere Werte. Die ca. 2-fach höhere Superoxiddismutase-Gesamtaktivität in der Lymphocytenfraktion des peripheren Bluts gegenüber den Granulocyten, deren physiologischer Superoxidradikalstoffwechsel während des Phagocytosevorgangs (2, 4, 5) bekannt ist, stellt einen konstanten Befund dar (52, 53, 55). Obgleich in den zellulären Subtypen (B- und T-Lymphocyten) signifikante Unterschiede der Superoxiddismutase-Gesamtaktivität vorliegen (43, 44, 53), ist die Frage einer speziellen Bedeutung des höheren Superoxiddismutase-Gehalts in Lymphocyten nicht geklärt.

Auf eine indirekte Bestimmung des Anteils der Mn Superoxiddismutase-Aktivität an der in den Zellhomogenaten gemessenen Gesamtaktivität durch Cyanidhemmung der Cu/Zn Superoxiddismutase (113) wurde verzichtet, da sowohl bei der Standardisierung des Cytochrom c -Reduktionshemmtests (siehe Mat. und Methoden 2.3.4.1.) als auch des Nitritformationshemmtests (siehe Mat. und Methoden 2.3.4.2.) gereinigte Cu/Zn Superoxiddismutase verwendet wurde und die Kinetik der Reduktionshemmung des Cytochrom c für gereinigte Mn Superoxiddismutase nicht bestimmt wurde.

Bei der Messung von Superoxiddismutase-Aktivität in Zellhomogenaten mit indirekten Verfahren (z.B. Cytochrom c -Reduktionshemmtest) ist auf die eingeschränkte Spezifität der $\cdot\text{O}_2^-$ -Produktion durch das Xanthin/Xanthinoxidase -System (1, 26, 32), die Interferenz mit Cytochrom c Oxidoreduktasen in der Probelösung (1) und die allgemeine Störanfälligkeit z.B. aufgrund von Schwankungen des pH-Wertes und der Meßtemperatur (54) hinzuweisen.

Da in dem Konzentrationsbereich von 0,5 bis 3,0 mM Cyanid die untersuchte Kinetik des Cytochrom c -Reduktionshemmtests nur von der Hemmung der Cu/Zn Superoxiddismutase abhängig war (siehe Abb. 11, Seite 40) und bereits 2 mM Cyanid im Testansatz circa 95 % der Cu/Zn Superoxiddismutase-Aktivität hemmten, wird der

Anteil der Cu/Zn Superoxiddismutase an der Gesamtaktivität kalkulierbar. Die durch Cyanid (3 mM) nicht hemmbare Superoxiddismutase-Aktivität mit der Aktivität der Mn Superoxiddismutase quantitativ gleichzusetzen, erscheint aus den genannten Gründen nicht gerechtfertigt.

Hinsichtlich der Gesamtaktivität der Superoxiddismutase in peripheren Lymphocyten von Patienten mit einem lymphoplasmocytoiden Lymphom (B-Zell Lymphom) war kein signifikanter Unterschied zu Lymphocyten gesunder Spender meßbar. Dies steht im Gegensatz zur signifikant erhöhten Superoxiddismutase-Gesamtaktivität in peripheren Blutlymphocyten von Patienten, die an einer chronisch lymphatischen Leukämie (CLL) erkrankt waren (118). Die Erklärung dieses differenten Befunds liegt in der leukämischen Ausschwemmung der CLL-Lymphocyten im Gegensatz zu den hier untersuchten Lymphocyten, die keine derartige Poolverschiebung in dem vorliegenden Stadium der Erkrankung zeigten. Entsprechend den gefundenen Ergebnissen war in einer Untersuchung von T- und B-Lymphomzelllinien kein signifikant meßbarer Unterschied der Superoxiddismutase-Aktivität nachweisbar (66).

4.2. Cu/Zn Superoxiddismutase aus normaler Milz und Lymphom-Milz des Menschen

Um einen direkten Vergleich zu ermöglichen, erfolgte die Isolierung der Cu/Zn Superoxiddismutase aus Lymphom-Milz und erstmals aus normaler Milz des Menschen entsprechend der Reinigung des Enzyms aus Lymphom-Milz (43) nach der Methode von Weisiger und Fridovich (113) für Hühnerleber.

Die ca. 10-fach niedrigere spezifische Aktivität (Units/mg Protein) im Milzgewebe gegenüber Lebergewebe des Menschen (117) entspricht der hier gemessenen spezifischen Superoxiddismutase-Aktivität in den Milzrohhomogenaten. Deren identische Gesamtak-

tivität (Total Units) erlaubt einen direkten Vergleich der Trennungsgänge hinsichtlich Anreicherung der Cu/Zn Superoxiddismutase und deren Ausbeute (siehe Ergebnisse 3.2.11., Tabelle A und B).

Bis zum Reinigungsschritt der Acetonfällung und der anschließenden Dialyse steht die erzielte Ausbeute (ca. 30-40%) der beiden Präparationen aus Milzgewebe mit der entsprechenden Angabe (32 %) bei der Reinigung aus Hühnerleber (113) und der Angabe (44%) der Erstisolierung aus Lymphom-Milz (43) in Einklang. Bei der in den Milzrohhomogenaten gemessenen Superoxiddismutase-Gesamtaktivität wird sowohl die cytoplasmatische Cu/Zn Superoxiddismutase (113) als auch die mitochondriale Mn Superoxiddismutase (69, 113) erfaßt. Während das Mn-Enzym durch den Chloroform-/Äthanol-schritt nach Tsuchihashi (109) im Trennungsgang inaktiviert wird, bleibt die Cu/Zn Superoxiddismutase stabil. Daraus erklärt sich die auch in der Literatur (113) beschriebene relativ hohe Abnahme der Gesamtaktivität in diesem Reinigungsschritt bei beiden Isolierungen.

Durch die Bestimmung des Hämoglobingehalts in den Milzrohhomogenaten wird der Anteil der Cu/Zn Superoxiddismutase aus dem Erythrocytenlysate, das als "Verunreinigung" im Gewebshomogenat mitgeführt wird, kalkulierbar. Ausgehend von der auf Gramm Hämoglobin bezogenen Cu/Zn Superoxiddismutase-Aktivität (circa 2000 U/g Hb) in Human-Erythrocyten (51) ergibt sich, daß dieser Anteil im Rohhomogenat der normalen Milz und der Lymphom-Milz des Menschen 12 % bzw. 7 % der Gesamtaktivität ausmacht. Auf eine indirekte Bestimmung des Anteils der mitochondrialen Mn Superoxiddismutase-Aktivität in den Milzrohhomogenaten wurde aus den in 4.1. angeführten Gründen verzichtet.

Der Reinigungsschritt der Kationenaustauschchromatographie (siehe Ergebnisse 3.2.8.) ist für den Trennungsgang der Cu/Zn Superoxiddismutase aus Milzgewebe des Menschen von Bedeutung. Während unter den angegebenen Bedingungen für die Hauptfraktion der Cu/Zn Superoxiddismutase aus Human-Erythrocyten keine Bindung an CM 50 erreicht wurde (36), wird ein Superoxiddismutase-aktives Protein aus Milzgewebe gebunden. Der relativ

hohe Ausbeuteverlust dieses Trennverfahrens wurde schon bei der Erstisolierung festgestellt (43). Das Bindungsverhalten wird durch die Analyse des Proteinmusters nach isoelektrischer Fokussierung (siehe Abb. 21 A und B, Seite 91) verständlich. Die Superoxiddismutase-aktiven Banden der in der CM 50-Chromatographie gebundenen Proteine zeigen insgesamt höhere isoelektrische Punkte als die vergleichsweise mitdargestellten nicht bindenden Isoenzyme gereinigter Cu/Zn Superoxiddismutase aus Human-Erythrocyten. Bei höherer Auflösung des pH-Gradienten (siehe Abb. 28, Seite 109) entsprechen die Proteinbanden der gereinigten Cu/Zn Superoxiddismutase aus Milzgewebe im anodischen Anteil einer der insgesamt 5 Isoenzymbanden der Cu/Zn Superoxiddismutase aus Human-Erythrocyten.

Die Ergebnisse des Proteinmapping der gereinigten Cu/Zn Superoxiddismutase aus menschlichem Milzgewebe sind mit diesen analytischen Befunden aus dem Trennungsgang vereinbar. Das gereinigte Enzym aus Normal-Milz (Abb. 31, Seite 114) zeigt einen Protein-spot (I.P. = 5,1; 51000 Dalton), der einem der Isoenzyme aus Human-Erythrocyten analog ist. Die gereinigte Cu/Zn Superoxiddismutase aus Lymphom-Milz besitzt trotz des im Vergleich heterogenen Musters (Abb. 32, Seite 115) ebenfalls ein entsprechendes Isoenzym (I.P. = 5,1; 51000 Dalton).

Im Gegensatz zur verbesserten Isolierungstechnik für Cu/Zn Superoxiddismutase aus Rindermilz (36), die ergänzend zum Präparationsverfahren aus Hühnerleber (113) nach der Gelfiltrationschromatographie über Sephadex G75 einen DEAE-Chromatographie-Schritt anschließt, ließ sich für die Isolierung der Cu/Zn Superoxiddismutase aus Human-Milz kein derartiger Präparationsvorteil erzielen. Nach der Eluierung der Cu/Zn Superoxiddismutase aus normaler Milz von der DEAE A50-Säule (Abb. 24 A, Seite 100) war eine drastische Verminderung (ca. 80 %) der spezifischen Aktivität in der Superoxiddismutase-aktiven Proteinfraction meßbar.

Die analytische Untersuchung dieser Cu/Zn Superoxiddismutase mittels Polyacrylamid-Diskgelelektrophorese (Abb.30, Seite 112)

erklärt diesen Befund: während die langsam wandernde Cu/Zn Superoxiddismutase-Proteinbande eine Aufspaltung in zwei Aktivitätsbanden zeigt, stellt sich zusätzlich eine elektrophoretisch schneller wandernde Proteinbande ohne zuordnbare Aktivitätsbande dar. Eine Aufspaltung in mehrere Superoxiddismutase-Aktivitätsbanden wird bei geringem präparationsbedingtem Metallverlust - nach Stansell und Deutsch (104) etwa 8 % - beschrieben und kann auch nach den Untersuchungen von Zepp et al. (119) einen Hinweis auf konformative Änderungen geben. Sie ist sowohl für gereinigte Cu/Zn Superoxiddismutase aus Human-Erythrocyten (6) als auch für Cu/Zn Superoxiddismutase aus Rindermilz (43) typisch und unabhängig von einer hohen spezifischen Aktivität. Die zusätzliche Proteinbande dagegen deutet auf eine teilweise Denaturierung des Gesamtproteins bei der DEAE-Chromatographie hin, die sich in der niedrigen spezifischen Aktivität widerspiegelt.

Die für die Untereinheiten der gereinigten Cu/Zn Superoxiddismutase aus Milzgewebe des Menschen bestimmten Molekulargewichte (1 % SDS, 0,1 % β -Mercaptoäthanol) sind mit den angegebenen Daten der Literatur identisch (6, 39). Die erkennbare Tendenz zur Polymerisierung dieser Untereinheiten unter nicht-reduzierenden Bedingungen ist beschrieben (6) und wurde auch bei Cu/Zn Superoxiddismutase aus Hühnerleber (113) und einem Isoenzym der Cu/Zn Superoxiddismutase aus Human-Erythrocyten (36) beobachtet. Diese Befunde korrelieren mit dem Verhalten der Cu/Zn Superoxiddismutase aus Human-Milz in der Elektrophorese auf einem hyperbolen SDS-Gradientengel (siehe Ergebnisse 3.3.3.), bei der ebenfalls die starke Tendenz zur Polymerisierung der Monomere, die auf eine Aggregationsneigung des Enzyms in Anwesenheit von SDS zurückgeführt wird (40), in Erscheinung tritt. Das identische Verhalten des Cu/Zn Superoxiddismutase-Polymers aus normaler Milz im Vergleich zu dem beschriebenen Cu/Zn Superoxiddismutase-Isoenzym aus Human-Erythrocyten wurde bereits betont. Inwieweit das heterogene Muster der Cu/Zn Superoxiddismutase aus Lymphom-Milz, das neben dem entsprechenden Polymer der Cu/Zn Superoxiddismutase aus normaler Milz noch zwei weitere, stärkere Protein-

spots aufweist, spezifisch für dieses Enzym ist, muß offen bleiben. Das bei der Erstisolierung (43) angegebene Molekulargewicht der "nativen" Cu/Zn Superoxiddismutase aus menschlicher Lymphom-Milz (36000 ± 2000 Dalton), welches gegenüber dem in der Literatur angeführten Molekulargewicht der Cu/Zn Superoxiddismutase aus Human-Erythrocyten (39) zu hoch lag, dürfte nach den hier gewonnenen Befunden dem Molekulargewicht eines Polymers der Untereinheiten des Enzyms aus Milzgewebe entsprochen haben.

Die Metallgehaltsanalyse nach der G 75-Chromatographie in den gereinigten Cu/Zn Superoxiddismutasen aus Milzgewebe deutet auf einen etwa gleich hohen prozentualen, im Bereich der Norm (104) liegenden Metallverlust an Kupfer und Zink hin. Die vergleichbare Präparation der Cu/Zn Superoxiddismutase aus Rindermilz nach demselben Verfahren und die Erstisolierung aus Lymphom-Milz (43) zeigten ebenfalls keinen signifikanten Metallverlust. Die Metallanalyse (vor Entsalzung) wurde in Gegenwart von 0,1 % β -Mercaptoäthanol im Lösungspuffer der Proben durchgeführt. Aufgrund einer durch den Lösungspuffer bedingten Dissoziation in Untereinheiten, die der besonderen Labilität der Cu/Zn Superoxiddismutase aus Milzgewebe unter reduzierenden Bedingungen entspricht, muß der Metallgehalt auf Untereinheiten bezogen werden.

Gereinigte Cu/Zn Superoxiddismutase aus Lymphom-Milz zeigt in indirekten Aktivitätstestverfahren eine deutlich niedrigere spezifische Aktivität (1280 Units/mg Protein) als das Enzym aus normaler Milz, dessen spezifische Aktivität derjenigen gereinigter Cu/Zn Superoxiddismutasen aus Human-Erythrocyten (6) entspricht. In der vergleichenden Übersicht der einzelnen Reinigungsschritte der Präparationen von Cu/Zn Superoxiddismutase aus Milzgewebe (siehe Ergebnisse 3.2.12.) läßt sich die schrittweise Anreicherung verfolgen: ein wesentlicher Stabilitätsverlust ist nicht erkennbar. Die Möglichkeit eines Einflusses des Trennverfahrens auf die teilweise Denaturierung der Cu/Zn Superoxiddismutase aus Lymphom-Milz ist nicht auszuschließen und wäre ein Hinweis auf einen strukturellen Unterschied dieses Enzyms.

Die Ergebnisse der Pulsradiolyse sind in dieser Hinsicht sehr aufschlußreich, da sie auf eine besonders labile Bindung des Kupfers in der Superoxiddismutase aus Lymphom-Milz hinweisen. Da Kupfer im aktiven Zentrum dieser Metallenzyme wesentlich zur Katalyse der Dismutation beiträgt (31, 115, 116), wird das unterschiedliche Aktivitätsverhalten der beiden isolierten Cu/Zn Superoxiddismutasen möglicherweise durch strukturelle Unterschiede in diesem Molekülbereich bedingt. Die Cu/Zn Superoxiddismutase aus normaler Milz scheint in diesem Punkt der Superoxiddismutase aus Human-Erythrocyten mit vergleichbaren katalytischen Eigenschaften zu entsprechen.

Faßt man diese Befunde der Isolierungstechnik und Analytik zusammen, so darf festgestellt werden, daß die aus Lymphom-Milz isolierte Cu/Zn Superoxiddismutase sich von dem Enzym aus normaler Milz in proteinchemischer und funktioneller Hinsicht unterscheidet.

Die mit Hilfe eines polyklonalen monospezifischen Antikörpers gegen Cu/Zn Superoxiddismutase aus Human-Erythrocyten erzielten Ergebnisse der immunologischen Untersuchungen zeigen, daß die isolierten Cu/Zn Superoxiddismutasen aus Normal-Milz und Lymphom-Milz des Menschen mit dem Enzym aus Human-Erythrocyten überlappende antigene strukturelle Eigenschaften aufweisen, sich aber von den entsprechenden Enzymen aus Rindergewebe deutlich unterscheiden. Diese Befunde unterstreichen die Notwendigkeit des Vergleichs species-identischer Enzyme, wie er in der vorliegenden Arbeit für Cu/Zn Superoxiddismutase aus menschlichem Milzgewebe erstmals durchgeführt wurde.

Die genaue strukturelle Ursache des differenten Verhaltens der aus Normal-Milz und aus Lymphom-Milz des Menschen isolierten Cu/Zn Superoxiddismutasen bleibt offen, aber es darf aufgrund der dargelegten Befunde, welche diejenigen der Erstisolierung (43) erhärten und erweitern, angenommen werden, daß im Lymphom-Milzgewebe und in Lymphom-Zellen bei erhöhter O_2^- -Radikalkon-

zentration keine physiologisch katalysierte Dismutase-Reaktion (Cu/Zn Superoxiddismutase) zur Verfügung steht. Dies mag für therapeutische Ansätze von Interesse sein.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Mittels eines modifizierten Verfahrens der Dichtegradientenzentrifugation wurden Lymphocyten und polymorphkernige Granulocyten gesunder Spender sowie an lymphoplasmocytoidem Lymphom erkrankter Patienten erythrocytenfrei gewonnen. Die Bestimmung der Superoxiddismutase-Gesamtaktivität mit indirekten Testverfahren ergab gegenüber Granulocyten etwa doppelt so hohe Werte für die Enzymaktivität in Lymphocyten.

Ein signifikanter Unterschied der Superoxiddismutase-Aktivität in den Homogenaten der Leukocyten-Populationen gesunder Spender und an Lymphom erkrankter Patienten ließ sich nicht feststellen.

Die Isolierung von Cu/Zn Superoxiddismutase aus normaler Milz und aus Lymphom-Milz des Menschen wurde in gleichen Trennungsgängen unter Anwendung klassischer Methoden wie Aussalzen und Ausfällen der Proteine mit organischen Lösungsmitteln und säulenchromatographischer Techniken durchgeführt. Sie stellte die Voraussetzung für den erstmaligen Vergleich der speciesidentischen Enzyme im direkten Aktivitätstestverfahren und mit Methoden der proteinchemischen Analytik dar. Die Untersuchungen an den gereinigten Enzymen zeigten, daß sich die aus Lymphom-Milz isolierte Cu/Zn Superoxiddismutase von dem Enzym aus normaler Milz sowohl in funktioneller als auch in proteinchemischer Hinsicht unterscheidet: während die gereinigte Cu/Zn Superoxiddismutase aus normaler Milz mit einer durch Pulsradiolyse bestimmten Reaktionsgeschwindigkeitskonstante von $2,17 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ dem Enzym aus Human-Erythrocyten gesunder Spender vergleichbar erscheint, liegt die entsprechende Konstante der aus Lymphom-Milz isolierten Cu/Zn Superoxiddismutase mit $1,2 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ deutlich niedriger. Dieses Enzym weist in den pulsradiolytischen Untersuchungen eine auffallend labile Bindung des Kupfers im aktiven Zentrum auf. Die stark verminderte Fähigkeit zur Dismutationskatalyse wird auch im indirekten Aktivitätstest (spe-

zifische Aktivität: 1280 U/mg Protein) der gereinigten Cu/Zn Superoxiddismutase aus Lymphom-Milz deutlich. In demselben Test ließ sich für das Enzym aus normaler Milz eine spezifische Aktivität von 3460 U/mg Protein nachweisen, die der spezifischen Aktivität des Enzyms aus Human-Erythrocyten entspricht.

Die Metallgehaltsanalyse ergab für Cu/Zn Superoxiddismutase aus normaler Milz je 0,9 g Atom Kupfer und Zink pro Untereinheit, für das Enzym aus Lymphom-Milz je 0,8 g Atom Kupfer und Zink pro Untereinheit. Durch SDS-Diskgelelektrophorese wurden unter reduzierenden Bedingungen die Molekulargewichte der Untereinheiten ermittelt, die mit 17000 Dalton (Normal-Milz) bzw. 18000 Dalton (Lymphom-Milz) den bekannten Molekulargewichten der Untereinheiten von Cu/Zn Superoxiddismutasen aus anderen Geweben menschlichen Ursprungs entsprechen. Der isoelektrische Punkt beider untersuchter Milz-Enzyme liegt bei pH 5,1 und kann einem Isoenzym der Cu/Zn Superoxiddismutase aus Human-Erythrocyten zugeordnet werden, deren Hauptisoenzym einen isoelektrischen Punkt von pH 4,9 besitzt. Im Proteinmapping läßt die Cu/Zn Superoxiddismutase aus Lymphom-Milz ein im Vergleich heterogenes Proteinmuster erkennen.

In immunologischen Untersuchungen mittels eines gegen Cu/Zn Superoxiddismutase aus Human-Erythrocyten gerichteten polyklonalen monospezifischen Antikörpers wurde deutlich, daß die aus Normal-Milz und Lymphom-Milz des Menschen isolierten Cu/Zn Superoxiddismutasen überlappende antigene strukturelle Eigenschaften aufweisen, während die entsprechenden species-verschiedenen Enzyme aus Rindergewebe nicht mit dem genannten Antikörper reagierten.

Die erhebliche Verminderung der Dismutaseaktivität des aus Lymphom-Milz isolierten Enzyms zeigt für therapeutische Überlegungen einen interessanten Aspekt: das Fehlen eines ausreichenden enzymatischen Schutzmechanismus gegen Sauerstoffradikale in Lymphom-Milzgewebe. Davon ausgehend kann eine höhere Vulnerabilität der Lymphomzellen bei einer Steigerung der zellulären Konzentration von Sauerstoffradikalen angenommen werden.

6. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. AZZI, A., MONTECUCCO, C., RICHTER, C.: The use of acetylated ferricytochrome c for the detection of superoxide radicals produced in biological membranes.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 65, 597 (1975)
2. BABIOR, B.M.: Superoxide production by phagocytes.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 91, 222 (1979)
3. BABIOR, B.M., CURNUTTE, J.T., Mc MURRICH, B.J.: The particulate superoxide-forming system from human neutrophils: properties of the system and further evidence supporting its participation in the respiratory burst.
J. Clin. Invest. 58, 989 (1976)
4. BABIOR, B.M., KIPNES, R.S.: Superoxide-forming enzyme from human neutrophils: evidence for a flavin requirement.
Blood 50, 517 (1977)
5. BABIOR, B.M., KIPNES, R.S., CURNUTTE, J.T.: Biological defense mechanisms. The production by leucocytes of superoxide, a potential bactericidal agent.
J. Clin. Invest. 52, 741 (1973)
6. BANNISTER, W.H., ANASTASI, A., BANNISTER, J.V.: Human erythrocyte superoxide dismutase (erythrocuprein). In: "Superoxide and Superoxide Dismutases" (Michelson, A.M., Mc Cord, J.M., Fridovich, I., eds.).
Academic Press, London, 1977, S. 107
7. BARRA, D., MARTINI, F., BANNISTER, J.V., SCHININA, N.E., ROTILIO, G., Bannister, W.H., Bossa, F.: The complete amino acid sequence of human Cu/Zn superoxide dismutase.
FEBS Letters 120/1, 53 (1980)

8. BARTKOWIAK, A., BARTKOWIAK, J.: Superoxide dismutase and catalase activities in normal and cancerous tissues.
Comp. Biochem. Physiol. 70B, 819 (1981)
9. BARTOLI, G.M., BARTOLI, S., GALEOTTI, T., BERTOLI, E.: Superoxide dismutase content and microsomal lipid composition of tumours with different growth rates.
Biochim. Biophys. Acta 620, 205 (1980)
10. BARTOLI, G.M., GALEOTTI, T., AZZI, A.: Production of superoxide anions and hydrogen peroxide in Ehrlich ascites tumour cell nuclei.
Biochim. Biophys. Acta 497, 622 (1977)
11. BEAUCHAMP, Ch., FRIDOVICH, I.: Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels.
Anal. Biochem. 44, 276 (1971)
12. BENON, H., BIELSKI, J., GEBICKI, J.M.: Application of radiation chemistry to biology. In: "Free radicals in biology" (Pryor, W., ed.).
Academic Press, New York, 1977, Vol. 3, S. 1
13. BIZE, I.B., OBERLEY, L.W., MORRIS, H.P.: Superoxide dismutase and superoxide radical in Morris hepatomas.
Cancer Res. 40, 3686 (1980)
14. BOVERIS, A.: Mitochondrial production of superoxide radical and hydrogen peroxide. In: "Oxygen and physiological function (Jöbsis, F.F., ed.)
Professional Information Library, 1977, S. 67
15. BOYUM, A.: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood: isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 21 (Suppl. 97), 77 (1967)

16. BOZZI, A., MAVELLI, I., FINAZZI AGRO, A., STROM, R., WOLF, A.M., MONDOVI, B., ROTILIO, G.: Enzyme defense against reactive oxygen derivatives. II. Erythrocytes and tumor cells.
Mol. Cell. Biochem. 10; 11 (1976)
17. BROWNING, D.R.: Spectroscopy.
Mc Graw-Hill, London (1969)
18. CARRICO, R.J., DEUTSCH, H.F.: Isolation of human hepatocuprein and cerebrocuprein.
J. Biol. Chem. 244, 6087 (1969)
19. CARRICO, R.J., DEUTSCH, H.F.: The presence of zinc in human cytocuprein and some properties of the apoprotein.
J. Biol. Chem. 245, 723 (1970)
20. COHEN, G., HEIKKILA, R.: The generation of hydrogen peroxide, superoxide radical and hydroxyl radical by 6-hydroxydopamine dialuric acid and related cytotoxic agents.
J. Biol. Chem. 249, 2447 (1974)
21. CURNUTTE, J.T., WHITTEN, D.M., BABIOR, B.M.: Defective superoxide production by granulocytes from patients with chronic granulomatous disease.
New Engl. J. Medic. 290, 593 (1974)
22. DAVIS, B.J.: Disc electrophoresis II. Method and application to human serum proteins.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 404 (1964)
23. DEWALD, B., BAGGIOLINI, M., CURNUTTE, J.T., BABIOR, B.M.: Subcellular localization of the superoxide-forming system in human neutrophils.
J. Clin. Invest. 63, 21 (1979)

24. DIONISI, O., GALEOTTI, T., TERRANOVA, T., AZZI, A.: Superoxide radicals and hydrogen peroxide formation in mitochondria from normal and neoplastic tissues.
Biochim. Biophys. Acta 403, 292 (1975)
25. DORFMAN, L.M., ADAMS, G.E.: Reactivity of the hydroxyl radical in aqueous solutions
NSRDS-NBS No 46, US Department of Commerce, National Bureau of Standards, Bethesda (1979)
26. ELSTNER, E.F., Botanisches Institut der Technischen Universität München.
Persönliche Mitteilung
27. ELSTNER, E.F., HEUPEL, A.: Inhibition of nitrite formation from hydroxylammoniumchloride: a simple assay for superoxide dismutase.
Anal. Biochem. 70, 616 (1976)
28. FEE, J.A., GABER, B.P.: Anion binding to bovine erythrocyte superoxide dismutase.
J. Biol. Chem. 247, 60 (1972)
29. FIELDEN, E.M., ROBERTS, P.B., BRAY, R.C., LOWE, D.J., MAUTNER, G.N., ROTILIO, G., CALABRESE, L.: The mechanism of action of superoxide dismutase from pulse radiolysis and electron paramagnetic resonance.
Biochem. J. 139, 49 (1974)
30. FONG, K.L., MC CAY, P.B., POYER, J.L., KEELE, B.B., MISRA, H.: Evidence that peroxidation of lysosomal membranes is initiated by hydroxyl free radicals produced during flavin enzyme activity.
J. Biol. Chem. 248, 7792 (1973)

31. FRIDOVICH, I.: Oxygen radicals, hydrogen peroxide and oxygen toxicity. In: "Free radicals in biology" (Pryor, W., ed.). Academic Press, New York, 1976, S. 239
32. FRIDOVICH, I.: Quantitative aspects of the production of superoxide anion radical by xanthine oxidase. J. Biol. Chem. 245, 4053 (1970)
33. FRIDOVICH, I.: The biology of oxygen radicals. Science 201, 733 (1978)
34. GABIG, T.G., BABIOR, B.B.: The $\cdot\text{O}_2^-$ -forming oxidase responsible for the respiratory burst in human neutrophils. J. Biol. Chem. 254, 9070 (1979)
35. GILBERT, D.L.: Speculation on the relationship between organic and atmospheric evolution Perspectives Biol. Med. 4, 58 (1960)
36. GROENEVELD, G.: Cu/Zn Superoxiddismutase aus Milzgewebe von gesunden Rindern und Rindern mit serologisch nachgewiesenem Antikörper gegen das bovine Leukämie-Virus (BLV). Vergleich zu Cu/Zn Superoxiddismutase aus Human-Erythrocyten. Inaugural-Dissertation, Ludwig Maximilians-Universität München, Fachbereich Medizin; in Druck
37. HALLIWELL, B.: Generation of hydrogen peroxide, superoxide and hydroxyl radicals during the oxidation of bihydroxyfumaric acid by peroxidase. Biochem. J., 163, 444 (1977)
38. HALLIWELL, B.: Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron chelates. FEBS Letters 92, 321 (1978)

39. HARTZ, J.W., DEUTSCH, H.F.: Preparation and physicochemical properties of human erythrocyte.
J. Biol. Chem. 244, 4565 (1969)
40. HARTZ, J.W., DEUTSCH, H.F.: Subunit structure of human superoxide dismutase.
J. Biol. Chem. 247, 7043 (1972)
41. HATCHIKIAN, C.E., LEGALL, J., BELL, G.R.: Significance of superoxide dismutase and catalase activities in the strict anaerobes, sulfate reducing bacteria. In: "Superoxide and Superoxide Dismutases" (Michelson, A.M., Mc Cord, J.M., Fridovich, I., eds.), Academic Press, London, 1977, S. 159
- 41a. HIJMANS, W., SCHUTT, H.R.E., KLEIN, F.: An immunofluorescence procedure for the detection of intracellular immunoglobulins. Clin. Exp. Immunol. 4, 457 (1969)
42. HÖFER, P.: Zur serologischen Erkennung männlich-geschlechtsspezifischer Zelloberflächenantigene.
Diplomarbeit, Ludwig Maximilians-Universität München, Fachbereich Biologie (1981), S. 89
43. ISSELS, R.D.: Superoxiddismutase in lymphatischen Zellen.
Diplomarbeit, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Fakultät für Chemie und Pharmazie, 1980
44. ISSELS, R.D., SCHALHORN, A., THIEL, E.: Superoxide dismutase activity in T and B lymphoma and its possible relationship to radiation sensitivity. In: "Oxygen and Oxy-Radicals in Chemistry and Biology".
Academic Press, London, 1981, S. 667

45. ISSELS, R.D., WILMANN, W., WESER, U.: Superoxide dismutase activity in human malignant lymphoma. In: "Biological and Clinical Aspects of Superoxide and Superoxide Dismutase" (Bannister, W.H., Bannister, J.V., eds.). Elsevier North Holland, Inc., 1980, S. 281
46. JOENJE, H., ERIKSON, A.W., FRANTS, R.R., ARWERT, F., HOUWEN, B.: Erythrocyte superoxide dismutase deficiency in Fanconi's anaemia.
The Lancet, Jan. 28, 204 (1978)
47. JOHNSTON, R.B.JR., KEELE, B.B.JR., MISRA, H.P., LEHMEYER, J.E., WEBB, L.S., BAEHNER, R.L., RAJAGOPALAN, K.V.: The role of superoxide anion generation in phagocytic bactericidal activity. Studies with normal and chronic granulomatous disease leukocytes.
J. Clin. Invest. 55, 1357 (1975)
48. JOHNSTON, R.B.JR., LEHMEYER, J.E.: The involvement of oxygen metabolites from phagocytic cells in bactericidal activity and inflammation. In: "Superoxide and Superoxide Dismutases" (Michelson, A.M., McCord, J.M., Fridovich, I., eds.). Academic Press, London, 1977, S. 291
49. KEELE, B.B., MCCORD, J.M., FRIDOVICH, I.: Further characterization of bovine superoxide dismutase and its isolation from bovine heart.
J. Biol. Chem. 246, 2875 (1971)
50. KLEBANOFF, S.J.: Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes.
Annals Int. Med. 93, 480 (1980)

51. KOBAYASHI, Y., ISHIGAME, K., ISHIGAME, Y., USUI, T.: Superoxide dismutase activity of human blood cells. In: "Biochemical and Medical Aspects of Active Oxygen (Hayaishi, O.H., Asada, K., eds.). University Park Press, Baltimore, London, 1977, S. 247
52. KOBAYASHI, Y., ISHIGAME, K., ISHIGAME, Y., USUI, T.: Superoxide dismutase activity of human granulocytes and lymphocytes.
The Lancet, 865 (4/1977)
53. KOBAYASHI, Y., OKAHATA, S., SAKANO, T., TANABE, K., USUI, T.: Superoxide dismutase activity of T lymphocytes and non-T lymphocytes.
FEBS Letters, 98/2, 391 (1979)
54. KOBAYASHI, Y., OKAHATA, S., TANABE, K., USUI, T.: Evaluation of nitrite formation inhibition method in the determination of superoxide dismutase activity of human blood cells.
Hiroshima J. Med. Sci. 27, 203 (1978)
55. KOBAYASHI, Y., OKAHATA, S., TANABE, K., USUI, T.: Use of logit paper in determination of superoxide dismutase activity in human blood cells.
J. Immunol. Meth. 24, 75 (1978)
56. KONG, S., DAVISON, A.J.: The role of interactions between O_2 , H_2O_2 , $\cdot OH$, e^- and $\cdot O_2^-$ in free radical damage to biological systems.
Arch. Biochem. Biophys. 204, 18 (1980)
57. LAVELLE, F., MICHELSON, A.M., DIMITREJEVIC, L.: Biological protection by superoxide dismutase.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 55, 350 (1973)

58. LENGFELDER, E., Strahlenbiologisches Institut der Universität München.
Persönliche Mitteilung
59. LENGFELDER, E.: Strahleninduzierte und biochemische Bildung von Sauerstoffradikalen: Nachweis, Reaktivität, pathophysiologische und regulatorische Aspekte.
Habilitationsschrift, Medizinische Fakultät der Ludwig Maximilians-Universität München (1979)
60. LENNERT, K. in collaboration with MOHRI, N., STEIN, H., KAISERLING, E., MÜLLER-HERMELINK, H.K.: Malignant lymphomas other than Hodgkin's disease.
Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie und Histologie, 1. Band, Teil 3B. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
61. LESKO, S.A., LORENTZEN, R.J., TS'O, P.O.P.: Role of superoxide in deoxyribonucleic acid strand scission.
Biochemistry 19, 3023 (1980)
62. LIN, T.Z., SHEN, J.T., GANONG, W.F.: Evidence for the involvement of superoxide anion in dopamine- β -hydroxylase system.
Proc. Exp. Biol. Med. 146, 37 (1974)
63. LKB: Instruction. LKB ampholine PAG plates for analytical electrofocusing on polyacrylamide gels.
LKB-Produkter AB, Bromma, Schweden
64. LOWRY, O.H., ROSENBOUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J.: Protein measurement with folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)
65. MANN, T., KEILIN, D.: Haemocuprein and hepatocuprein, copper-protein compounds of blood and liver in mammals.
Proc. Roy. Soc. London Ser. B, 126, 303 (1939)

66. MARKLUND, S.L., WESTMAN, N.G., LUNDGREN, E., ROOS, G.:
Copper- and zinc-containing superoxide dismutase, manganese-containing superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in normal and neoplastic human cell lines and normal human tissues.
Cancer Res. 42, 1955 (1982)
67. MAURER, H.J. (ed.): "Disk Electrophoresis and Related Techniques of Polyacrylamide Gel Electrophoresis".
W. de Gruyter, Berlin, New York (1971)
68. MC CORD, J.M.: Free radicals and inflammation: protection of synovial fluid by superoxide dismutase.
Science 185, 529 (1974)
69. MC CORD, J.M., BOYLE, J.A., DAY, E.D., RIZZOLO, L.J., SALIN, M.L.: A manganese-containing superoxide dismutase from human liver. In: "Superoxide and Superoxide Dismutases" (Michelson, A.M., Mc Cord, J.M., Fridovich, I., eds.). Academic Press, London, 1977, S. 129
70. MC CORD, J.M., DAY, E.D.JR.: Superoxide-dependent production of hydroxyl radical catalyzed by iron-EDTA complex.
FEBS Lett. 86, 139 (1978)
71. MC CORD, J.M., FRIDOVICH, I.: Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein.
J. Biol. Chem. 244, 6049 (1969)
72. MC CORD, J.M., FRIDOVICH, I.: The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase.
J. Biol. Chem. 243, 5753 (1968)
73. MC CORD, J.M., WONG, K.: Phagocyte-produced free radicals: Roles in cytotoxicity and inflammation. In: "Oxygen free radicals and tissue damage" (Ciba Found. Symp. 65). Elsevier, Excerpta Medica North Holland, Amsterdam, 1979, S. 343

74. MCCORMICK, J.R., HARKIN, M.M., JOHNSON, K.J., WARD, P.A.:
Suppression by superoxide dismutase of immune-complex-induced pulmonary alveolitis and dermal inflammation.
Am. J. Pathol. 102, 55 (1981)

75. MENANDER- HUBER, K.B., HUBER, W.: Orgotein, the drug version of bovine superoxide dismutase. II. A summary account of clinical trials in man and animals. In: "Superoxide and Superoxide Dismutases" (Michelson, A.M., Mc Cord, J.M., Fridovich, I. eds.).
Academic Press, London, 1977, S. 537

76. MICHELSON, A.M.: Chemical production of superoxide anions by reaction between riboflavin, oxygen, and reduced nicotinamide adenine dinucleotide. Specificity of tests for $\cdot\text{O}_2^-$. In: "Superoxide and Superoxide Dismutases" (Michelson, A.M., Mc Cord, J.M., Fridovich, I., eds.).
Academic Press, London, 1977, S. 87

77. MISRA, H.P., FRIDOVICH, I.: The univalent reduction of oxygen by reduced flavins and quinones.
J. Biol. Chem. 247, 188 (1972)

78. MORGAN, A.R., CONE, R.L., ELGERT, T.M.: The mechanism of DNA strand breakage by vitamin C and superoxide and the protective roles of catalase and superoxide dismutase.
Nucleic Acids, Res., 3, 1139 (1976)

79. NEWBURGER, P.E., CHO VANIEC, M.E., COHEN, H.J.: Activity and activation of the granulocyte superoxide-generating system.
Blood 55, 85 (1980)

80. NIWA, T., YAMAGUCHI, H., YANO, K.: Radioprotection by superoxide dismutase: reduction of oxygen effect. In: "Biochemical and Medical Aspects of Active Oxygen" (Hayaishi, O.H., Asada, K., eds.). University Park Press, Baltimore, London, 209 (1977)
81. OBERLEY, L.W., BIZE, I.B., SAHU, S.K., LEUTHAUSER, S.W.H.C., GRUBER, H.E.: Superoxide dismutase activity of normal murine liver, regenerating liver and H6 hepatoma. J. Natl. Cancer Inst. 61, 375 (1978)
82. OBERLEY, L.W., BUETTNER, G.R.: Role of superoxide dismutase in cancer: a review. Cancer Res. 39, 1141 (1979)
83. O'FARRELL, P.H.: High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol. Chem. 250, 4007 (1975)
84. ORNSTEIN, L.: Disc electrophoresis - I. Background and theory. Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 321 (1964)
85. PANGANAMALA, R.V., BROWNLEE, N.R., SPRECHER, H., CORNWELL, D.G.: Evaluation of superoxide anion and singlet oxygen in the biosynthesis of prostaglandins from eicosa-8,11,14-trienoic acid. Prostaglandins 7, 21 (1974)
86. PANGANAMALA, R.V., SHARMA, H.M., SPRECHER, H., GEER, J.C., CORNWELL, D.G.: A suggested role for hydrogen peroxide in the biosynthesis of prostaglandins. Prostaglandins 8, 3 (1974)

87. PESKIN, A., KOEN, YA. M., ZBARSKY, I.B.,
KONSTANTINOV, A.A.: Superoxide dismutase and glutathione
peroxidase activities in tumors.
FEBS Letters 78, 41 (1977)
88. PORRAS, A.G., OLSON, J.S., PALMER, G.: The reaction of re-
duced xanthine oxidase with oxygen.
J. Biol. Chem. 256, 9096 (1981)
89. PUGET, K., MICHELSON, A.M.: Isolation of a new copper-con-
taining superoxide dismutase. Bacteriocuprein.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 58, 830 (1974)
90. RISTER, M., BAUERMEISTER, K., GRAVERT, U., GLADTKE, E.:
Superoxide dismutase deficiency in rheumatoid arthritis.
The Lancet, May 20, 1094 (1978)
91. ROBB-SMITH, A.H.T.: U.S. National Cancer Institute wor-
king formulation of non-Hodgkin's lymphomas for clinical
use.
The Lancet II, 432 (1982)
92. ROOT, R.K., METCALF, J.A.: H_2O_2 release from human granu-
locytes during phagocytosis. Relationship to superoxide
anion formation and cellular catabolism of H_2O_2 : Studies
with normal and cytochalasin β -treated cells.
J. Clin. Invest. 60, 1266 (1977)
93. ROSEN, H., KLEBANOFF, S.J.: Bactericidal activity of a su-
peroxide anion-generating system. A model for the poly-
morphonuclear leukocyte.
J. Exp. Med. 149, 27 (1979)

94. ROTILIO, G., BOZZI, A., MAVELLI, I., MONDOVI, B., Strom, R.: Tumor cells as models for oxygen-dependent cytotoxicity. In: "Biological and Clinical Aspects of Superoxide and Superoxide Dismutase" (Bannister, W.H., Bannister, J.V., eds.). Elsevier North Holland, Inc., 1980, S. 118
95. ROTILIO, G., BRAY, R.C., FIELDEN, E.M.: A pulse radiolysis study of superoxide dismutase. *Biochim. Biophys. Acta* 268, 605 (1972)
96. SAHU, S.K., OBERLEY, L.W., STEVENS, R.H., RILEY, E.F.: Superoxide dismutase activity of Ehrlich ascites tumor cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 58, 1125 (1977)
97. SALIN, M.L., BRIDGES, S.M.: Isolation and characterization of an iron-containing superoxide dismutase from eucaryote, *Brassica campestris*. *Arch. Biochem. Biophys.* 201, 369 (1980)
98. SALIN, M.L., MC CORD, J.M.: Free radicals and inflammation: Protection of phagocytosing leucocytes by superoxide dismutase. *J. Clin. Invest.* 56, 1319 (1975)
99. SALIN, M.L., MC CORD, J.M.: Free radicals in leukocyte metabolism and inflammation. In: "Superoxide and Superoxide Dismutases" (Michelson, A.M., Mc Cord, J.M., Fridovich, I., eds.). Academic Press, New York, 1977, S. 257
100. SALIN, M.L., MC CORD, J.M.: Superoxide dismutases in polymorphonuclear leukocytes. *J. Clin. Invest.* 54, 1005 (1974)

101. SBARRA, A.J., KARNOVSKY, M.L.: The biochemical basis of phagocytosis. Metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphonuclear leukocytes.
J. Biol. Chem. 234, 1355 (1959)
102. SCHOPF, J.W.: The evolution of the earliest cells
Sci. Am. 239, 111 (1978)
103. STACHER, A., WALDNER, R., THEML, H.: Klinik der malignen Non-Hodgkin-Lymphome entsprechend der Kieler Klassifikation: Lymphoplasmozytoides Lymphom und chronisch lymphatische Leukämie. In: Löffler, H. (Hrsg.): Maligne Lymphome und monoklonale Gammopathien. Hämatologie und Bluttransfusion, Vol. 18. Lehmann, München, S. 199 (1976)
104. STANSELL, M.J., DEUTSCH, H.F.: Physicochemical studies of crystalline human erythrocyuprein,
J. Biol. Chem. 240, 4306 (1965)
105. STEGEMANN, H.: SDS-gel-electrophoresis in polyacrylamide, merits and limits. In: "Electrokinetic Separation Methods" (Righetti, P.G., van Oss, C.D., Vanderhoff, J.W., eds.).
Elsevier North Holland Biomedical Press, 1979, S. 313
106. TAKESHIGE, K., MATSUMOTO, T., SHIBATA, R., MINAKAMI, S.: Simple and rapid method for the diagnosis of chronic granulomatous disease, measuring hydrogen peroxide and superoxide anions released from leukocytes in whole blood.
Clin. Chim. Acta 92, 329 (1979)
107. TIEN, M., SVINGEN, B.A., AUST, S.D.: Superoxide dependent lipid peroxidation.
Fed. Proc. 40, 179 (1981)

108. TOTTER, J.R.: Spontaneous cancer and its possible relationship to oxygen metabolism.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 1763 (1980)
109. TSUCHIHASHI, M.: Zur Kenntnis der Blutkatalase
Biochem. Z. 140, 63 (1923)
110. TURRENS, J.F., BOVERIS, A.: Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria.
Biochem. J. 191, 421 (1980)
111. VAN KAMPEN, E.J., ZIJLSTRA, W.G.: Standardization of hemoglobinometry. II. The hemoglobincyanide method.
Clin. Chim. Acta 6, 538 (1961)
112. WEBER, K., OSBORN, M.: The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.
J. Biol. Chem. 244, 4406 (1969)
113. WEISIGER, R.A., FRIDOVICH, I.: Superoxide dismutase. Organelle specificity.
J. Biol. Chem. 248, 3582 (1973)
114. WEISS, S.J.: The role of superoxide in the destruction of erythrocyte targets by human neutrophils.
J. Biol. Chem. 255, 9912 (1980)
115. WESER, U.: Structural aspects and biochemical function of erythrocuprein.
Structure and Bonding 17, 1 (1973)
116. WESER, U., BUNNENBERG, E., DAMMACK, R., DJERASSI, C., FLOHE, L., THOMAS, G., VOELTER, W.: A study on purified bovine erythrocuprein.
Biochim. Biophys. Acta, 243, 203 (1971)

117. WESTMAN, N.G., MARKLUND, S.L.: Copper- and zinc-containing superoxide dismutase and manganese-containing superoxide dismutase in human tissues and human malignant tumors.
Cancer Res. 41, 2962 (1981)
118. YAMANAKA, N., OTA, K., UTSUMI, K.: Changes in superoxide dismutase activities during development, aging, and transformation. In: "Biochemical and Medical Aspects of Active Oxygen" (Hayaishi, O., Asada, K., eds.)
University Park Press, Baltimore, 1978, S. 183
119. ZEPP, R.A., CHELACK, W.S., PETKAU, A.: Bovine superoxide dismutase preparations: comparison of their biochemical and biological characteristics. In: "Chemical and Biochemical Aspects of Superoxide and Superoxide Dismutase" (Bannister, J.V., Hill, H.A.O., eds.).
Elsevier North Holland, Inc., 1980, S. 201

Herrn Prof. Dr. W. Wilmanns schulde ich für die Überlassung der Arbeit und die Erlaubnis, die Laboreinrichtungen seiner Klinik zu benutzen, großen Dank.

Besonders danken möchte ich Herrn Dr. med. Dipl. biochem. Rolf Issels für die engagierte Einführung in die Thematik sowie seine hilfreiche Betreuung, verbunden mit wertvollen Anregungen und konstruktiver Kritik.

Großer und herzlicher Dank gilt meinem Kommilitonen und Freund, Herrn cand. med. Gerhard Groeneveld, der mit mir viele Stunden gemeinsam im Labor verbrachte und mir außergewöhnliche Kameradschaft entgegenbrachte.

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. E. Lengfelder, Strahlenbiologisches Institut der Universität München, sei herzlich für die Durchführung der pulsradiolytischen Untersuchungen und etliche gute Ratschläge gedankt.

Zu großem Dank verpflichtet bin ich auch Herrn Prof. Dr. E.F. Elstner und Herrn Dr. Youngman, Botanisches Institut der Technischen Universität München, für wertvolle Hinweise zur Lösung theoretischer und praktischer Probleme.

Herrn Prof. Dr. R. Lamerz, Medizinische Klinik II des Klinikums Großhadern, sei herzlich für seine überaus hilfreiche Unterstützung bei immunologischen Untersuchungen gedankt.

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. H. Sauer, Herrn Priv.-Doz. Dr. med. A. Schalhorn, Herrn Priv.-Doz. Dr. med. W. Siegert und Herrn Dr. med. H. Wagner von der Medizinischen Klinik III des Klinikums Großhadern, die mir die Mitbenutzung ihrer Laboreinrichtungen gestatteten und mir manch guten Rat erteilten, danke ich sehr.

Besonderen Dank schulde ich auch meinem Kommilitonen, Herrn cand. med. Robert Zimmermann. Er hat mich mit außerordentlichem Engagement und Können in die Technik der Polyacrylamid Gelelektrophorese auf Plattengelen eingeführt.

Hilfreiche Auskünfte und Ratschläge zur Methode der Dichtegradientenzentrifugation verdanke ich Herrn Dipl. biol. P. Höfer.

Herrn Prof. Dr. G. Heberer, Direktor der Chirurgischen Klinik des Klinikums Großhadern, und seinen Mitarbeitern sei für die Überlassung von Milzen aus dem Operationsgut der Klinik gedankt.

Für die detaillierte histologische Begutachtung der untersuchten Lymphom-Milz bin ich Herrn Prof. Dr. U. Loehrs, Pathologisches Institut der Universität München, sehr dankbar.

Herr Prof. Dr. H. Drexel, Direktor der Klinik für Physikalische Medizin im Klinikum Großhadern, gab mir dankenswerterweise die Erlaubnis, an dem Atomabsorptionsspektrophotometer seiner Abteilung Messungen durchzuführen.

Schließlich ist es mir ein Anliegen, auch Frau Marias meinen herzlichen Dank auszusprechen. Sie hat mir in unentwegtem, liebewürdigem Einsatz die Labor-Glasmaterialien gespült und mir dadurch sehr viel Zeit gespart.

LEBENS LAUF

Siegfried Wilhelm Johannes Prenninger, geboren am 22.2.1958 in Landshut als Sohn des Polizeibeamten Wilhelm Prenninger und dessen Ehefrau Marianne, geborene Werner

Besuch der Volksschule Landshut-Achdorf von 1964 - 1968

Nach der Absolvierung des neusprachlichen Hans-Carossa-Gymnasiums in Landshut Abitur 1977

Mit dem Wintersemester 1977/78 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Ludwig Maximilians-Universität München

August 1979	Ärztliche Vorprüfung in München
August 1980	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in München
März 1983	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in München

